

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

Die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine für die Hypoxie-induzierte
Erythropoietin-Bildung in menschlichen Neuroblastomzellen der Linie Kelly

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Stefanie Waltraud Fritz
aus Essen
2005

Dekan	Univ. - Prof. Dr. Karl - Heinz Jöckel
1. Gutachter:	Univ. - Prof. Dr. med. Joachim Fandrey
2. Gutachter:	Univ. -. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Herbert de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Fragestellung	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Zellkulturen	11
2.2	Proteinbestimmung für zelluläres Gesamtprotein	13
2.3	Vitalitäts- und Proliferationstest für Zellkulturen: MTT-Test	13
2.4	Messung spezifischer Proteine im Zellkulturüberstand	14
2.5	Isolation der Gesamt-RNS aus Zellkulturen mit saurem Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol	15
2.6	Bestimmung der RNS-Konzentration	16
2.7	Nachweis spezifischer mRNS	17
2.8	Präparation DNS-bindender Proteine aus der Zytoplasma- und der Kernfraktion von Kelly- und HepG2-Zellen	20
2.9	Bestimmung des Proteingehalts in Zellkern und Zytoplasma	21
2.10	Western-Blot	21
2.11	Transiente Transfektion des pH3SVL-Plasmids in Kelly-Zellen mittels Elektroporation	24
2.12	Statistische Auswertung	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Nachweis der hypoxischen Induzierbarkeit von Erythropoietin	26
3.2	Nachweis der biologischen Aktivität des Erythropoietins mithilfe des Ba/F3-Bioassays	28
3.3	Bildung von Erythropoietin in der Neuroblastomzelllinie Kelly nach Behandlung mit Zytokinen sowie einem NO-Donor	32

3.4	Zeitverlauf der Expression von Erythropoietin-mRNS nach Behandlung der Neuroblastomzelllinie Kelly mit TNF α und GSNO unter hypoxischer Inkubation	36
3.5	Detektion des Transkriptionsfaktors HIF-1 an Zellextrakten mittels Western-Blot	37
3.6	Detektion des Transkriptionsfaktors NF κ B an Zellextrakten mittels Western-Blot	41
3.7	Nachweis transkriptioneller Aktivität durch transiente Transfektion des pH3SVL-Plasmids in Kelly-Zellen	44
4.	Diskussion	48
4.1	Hypoxie-induzierte Expression biologisch aktiven Erythropoietins in der humanen Neuroblastomzelllinie Kelly	48
4.2	Modulation der hypoxischen Erythropoietin-Synthese in Kelly-Zellen durch Interleukin-1 β , Tumor Nekrose Faktor α und S-Nitroso-glutathion	50
4.3	Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Erythropoietin-Gen Aktivierung	52
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Anhang	77
	Danksagung	88
	Lebenslauf	89

1. Einleitung

Erythropoietin (EPO), ein Glykoproteinhormon mit einer Masse von etwa 30 kDa, reguliert die Bildung und Reifung erythrozytär determinierter Vorläuferzellen im Knochenmark. Es wird hauptsächlich von den peritubulären interstitiellen Zellen der Nieren und zu einem geringeren Teil in Parenchymzellen der Leber gebildet (Jelkmann, 1992; Maxwell et al., 1993; Maxwell et al., 1997). Die Sauerstoffkapazität des Blutes wird von der Erythropoietin-Syntheserate in Niere und Leber determiniert, auch wenn zusätzlich noch Erythropoietin-mRNS in anderen Geweben detektiert worden ist, z.B. in der Milz, der Lunge, dem Gehirn und im Hoden (Fandrey und Bunn, 1993). Aufgrund einer entstehenden Gewebehypoxie bei arterieller oder venöser Hypoxämie kommt es zur Stimulation der Erythropoietin-Bildung (Fandrey und Bunn, 1993) und so zum Wachstum erythrozytär determinierter Vorläuferzellen in den hämatopoietischen Organen.

Die bislang bekannten Mechanismen der Signalwege, die die Sauerstoffabhängige Erythropoietin-Bildung kontrollieren, wurden hauptsächlich an humanen Hepatomzelllinien erforscht. Zur Zeit werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, durch welche Strukturen, die „Sauerstoffsensoren“, Veränderungen im pO_2 erkannt werden. Hämproteine könnten eine solche Rolle übernehmen (Acker, 1994; Fandrey, 1995). Mitochondriale Cytochrome sind in der Lage reaktive Sauerstoffverbindungen als Signalmoleküle zu generieren (Chandel et al., 1998). Außerdem könnten b-Typ Cytochrome, die pO_2 -abhängig Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren, als Sensor dienen. Die bei einem hohen pO_2 gebildeten ROS hemmen die Expression des Erythropoietin-Gens (Fandrey et al., 1994; Fandrey und Genius, 2000), während sie bei einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck vermindert synthetisiert werden und eine hohe Erythropoietin-Bildungsrate zulassen.

Der Transkriptionsfaktor GATA-2, der 30 bp vor der Transkriptionsstartstelle im Erythropoietin-Promotor an die DNS bindet, gilt als möglicher Angriffspunkt von Wasserstoffperoxid zur Unterdrückung der Erythropoietin-Genexpression (Imagawa et al., 1996; Tsuchiya et al., 1997; Tabata et al., 2001).

Von großer Bedeutung für die Sauerstoff-abhängige Regulation der Expression des Erythropoietin-Gens ist aber auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1). Ein erhöhter Gehalt des HIF-1-Komplexes im Kern von Erythropoietin-bildenden Zellen unter Sauerstoffmangel führt zu einer vermehrten Bindung an entsprechende regulatorische Elemente im Erythropoietin-Gen und zu einer vermehrten Transkription der Erythropoietin-mRNS (Semenza, 1994). HIF-1 bindet an das Hypoxie-responsive Element (HRE) im 3' Enhancer des Erythropoietin-Gens. Die Bildung dieses Komplexes ist unter Hypoxie verstärkt, da die α -Untereinheit (120 kDa) von HIF-1 durch Sauerstoffmangel stabilisiert wird und mit der β -Untereinheit (91-94 kDa), die ständig im Zellkern anwesend ist, dimerisieren kann (Wang et al., 1995). Unter normoxischen Bedingungen wird die Sauerstoff-abhängige Domäne von HIF-1 α zum Ziel sofortiger Ubiquitin-kontrollierter Proteolyse (Salceda und Caro, 1997), bei der das von-Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Protein mitwirkt (Maxwell et al., 1999). Die Tatsache, dass Kobaltionen und Eisenchelatoren die Bildung des VHL-Komplexes verhindern und den Gehalt an HIF-1 erhöhen, könnte eine Antwort auf die Frage geben, warum durch Kobalt und Eisenchelatoren die Erythropoietin-Synthese stimuliert wird (Jelkmann, 1992).

Zusätzlich bindet HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4), ein konstitutiv in Leber und Niere gebildeter Transkriptionsfaktor, kooperierend mit HIF-1 an den 3'Enhancer des Erythropoietin-Gens (Bunn und Poyton, 1996). Die C-terminale aktivierende Domäne von HNF4 bindet an die α -Untereinheit von HIF-1, während der C-terminale Abschnitt der α -Untereinheit spezifisch an CBP/p300, einen

allgemeinen Transkriptionskoaktivator, bindet. Hemmung von CBP/p300 zeigte trotz Hypoxie eine Verminderung der Expression des Erythropoietin-Gens (Huang et al., 1997).

Nicht nur Hypoxie induziert die Bildung von HIF-1 α in humanen Hepatomzelllinien, sondern auch verschiedene Hormone und Zytokine. Insulin und Insulin-like Growth Factor (IGF) aktivieren HIF-1 in Hinblick auf die Induktion glykolytischer Enzyme sowie Membran-gebundener Glukosetransporter (Zelzer et al., 1998; Feldser et al., 1999). Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) hemmen die Expression des Erythropoietin-Gens (Jelkmann et al., 1992; Faquin et al., 1992; Fandrey et al., 1994), obwohl sie die Bindung des HIF-1-Komplexes an die DNS verstärken (Hellwig-Bürgel et al., 1999). Sie stimulieren jedoch andere HIF-1-abhängige hypoxisch-induzierbare Gene wie das VEGF-Gen (Vascular endothelial growth factor) und das der NO-Synthase. Die Bindungsaktivität von HNF4 wird reduziert.

Entzündliche und maligne Erkrankungen, die mit einer Aktivierung des Immunsystems und einer vermehrten Bildung proinflammatorischer Zytokine einhergehen, sind häufig durch eine Anämie chronischer Entzündungen gekennzeichnet (Jelkmann 1998; Means und Krantz, 1992). Es stellt sich die Frage, ob hier die negativ regulierenden Transkriptionsfaktoren wie GATA-2 und NF κ B, ein wichtiges Signalmolekül in inflammatorischen Prozessen, modulierend eingreifen. Patienten mit einer Tumoranämie leiden unter Dyspnoe, Fatigue-Syndrom, Lethargie und Depressionen. Der Versuch, diese Patienten mit Erythropoietin zu behandeln, ist weniger erfolgreich als bei Patienten mit renaler Anämie. Zum einen werden höhere Dosen rekombinanten Erythropoietins (rHu-EPO) eingesetzt (Cazzola et al., 1995), zum anderen benötigen die Erkrankten zusätzlich noch Transfusionen (Barosi et al., 1998). Trotzdem ist es sinnvoll, rHu-Erythropoietin zur Linderung der Anämie einzusetzen, da außerdem durch

Erhöhung der Sauerstoffkapazität des Blutes der Sauerstoffpartialdruck im Tumor steigt (Kelleher et al., 1996). Durch die verbesserte Tumoroxygenierung sinkt der Widerstand gegenüber Radio- und Chemotherapie (Green und Giacca, 1998). Die Bildung proangiogenetischer Wachstumsfaktoren nimmt ab (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Außerdem trägt die Hypoxie im Tumor zur Selektion Apoptose-resistenter Zellen bei (Graeber et al., 1996).

Die Hepatomzelllinien waren bisher das einzige Modell, das die in vivo-Bildung von Erythropoietin simulieren konnte. Kürzlich wurden zwei Neuroblastomzelllinien identifiziert, die ebenfalls in der Lage sind, Sauerstoff-abhängig Erythropoietin zu bilden (Stolze et al., 2002). In diesen Zellen akkumuliert unter Sauerstoffmangel der HIF-1-Komplex, um nach Bindung an entsprechende regulatorische DNS-Sequenzen die Expression des Erythropoietin-Gens zu erhöhen. Auffallend bei diesen Untersuchungen war, dass ausschließlich Zellen, die einem neuronalen Phänotyp entsprechen, Hypoxie-induziert Erythropoietin exprimieren und in den Kulturüberstand sezernieren. Da bekannt ist, dass auch Zellen des Zentralnervensystems Erythropoietin bilden und Erythropoietin dort möglicherweise neuroprotektiv wirkt (Sadamoto et al., 1998; Sakanaka et al., 1998; Dame et al., 2000), sind Untersuchungen an Neuroblastomzellen zur Regulation der Erythropoietin-Bildung von ganz besonderer Bedeutung. Es ist bisher nicht bekannt, ob die beobachteten Einflüsse inflammatorischer Zytokine und ihrer Mediatoren auch in die Regulation der Erythropoietin-Bildung in Neuroblastomzellen eingreifen.

1.1 Fragestellung

1. Im Überstand normoxischer und hypoxischer Kulturen der Neuroblastomzelllinie Kelly soll das Erythropoietin-Protein mit einem ELISA gemessen und festgestellt werden, ob sich mithilfe des Ba/F3-Assays seine biologische Aktivität nachweisen lässt. Die Ba/F3-Zellen sind stabil mit dem humanen Erythropoietin-Rezeptor transfiziert und proliferieren in Abhängigkeit von der Erythropoietin-Konzentration in ihrem Kulturmedium. Anschließend wird die hypoxische Induzierbarkeit der mRNS-Expression für Erythropoietin quantifiziert.
2. Nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit $IL-1\beta$ und $TNF\alpha$ sowie dem NO-Donor S-Nitrosoglutathion (GSNO) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen werden die Expression von Erythropoietin-mRNS und die Sekretion von Erythropoietin-Protein in den Kulturüberstand bestimmt. Von den Hepatomzellen ist bekannt, dass bereits nach einstündiger Inkubation mit den Zytokinen die Erythropoietin-Produktion abnimmt. Deshalb ist es notwendig, Untersuchungen mit verschiedenen Inkubationsdauern durchzuführen.
3. Nach Feststellung der Effekte auf die Erythropoietin-Bildung soll die Wirkung der inflammatorischen Zytokine und des Entzündungsmediators NO auf die Akkumulation von HIF-1 erfolgen. Dazu werden an Zellextrakten Western-Blots für die HIF-1 α - und die HIF-1 β -Untereinheit sowie für den Transkriptionsfaktor $NF\kappa B$ durchgeführt. Analog zu dem von Hepatomzellen bekannten Zeitgang der hypoxischen Akkumulation und Wirkung von Zytokinen erfolgen die Inkubationen mit den Neuroblastomzellen.

4. Um die Wirkung des möglicherweise akkumulierten HIF-1-Komplexes zu bestimmen, werden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt. Dazu werden Vektoren (pH3SVL) mit sechs HIF-1-Bindungsstellen in die Zellen transfiziert. Unter der Kontrolle der HIF-Bindungsstelle steht das Reportergen Luciferase, dessen Aktivität in Zellextrakten nachgewiesen werden kann. Nach transients Transfektion wird die Aktivität der Luciferase nach Behandlung mit Zytokinen und NO unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bestimmt.

Ziel der Arbeit ist der Nachweis der Bildung von biologisch-aktivem Erythropoietin durch Neuroblastomzellen (NB-Zellen). Zudem soll der Einfluss der Mediatoren des Immunsystems IL-1 β , TNF α und NO auf die Erythropoietin-Bildung in NB-Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Kelly-Zellen

Kürzlich wurden zwei humane Neuroblastomzelllinien identifiziert, die Sauerstoff-abhängig Erythropoietin bilden können und einem neuronalen Phänotyp entsprechen (Stolze et al., 2002). Die humane Neuroblastomzelllinie Kelly wurde für die Untersuchung der Einflüsse rekombinanter Zytokine und eines NO-Donors auf die Erythropoietin-Bildung in vitro ausgewählt, da sie eine besonders deutliche Sauerstoff-abhängige Regulation der Erythropoietin-Bildung zeigt (Stolze et al., 2002). Die Zellen wurden uns freundlicherweise von der Universitätskinderklinik Essen zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin, 2,2 g/l Natriumbikarbonat, 10% fetalem Kälberserum (beide BioWhittaker Europe; Verviers, Belgien), 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide Gibco BRL) in 75 cm² Polystyrol-Kulturflaschen (Greiner Bio-One) in Wasserdampf-gesättigter Luft mit 5% Kohlendioxid bei 37°C (Heraeus Inkubator, Heraeus; Hanau) gezüchtet. Das Medium wurde zweimal wöchentlich erneuert. Bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² wurden die Zellen subkultiviert. Für die Experimente wurden die Zellen auf Kulturplatten mit sechs oder 24 Vertiefungen oder speziellen Petrischalen mit Gas-durchlässigem Boden aus hydrophilem FEP-Teflon (alle Greiner Bio-One Cellstar[®]) inkubiert. Die Experimente wurden mit konfluenten Kulturen, entsprechend einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² durchgeführt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten alle Kulturen frisches Medium. Die Zellen wurden danach in normoxischer (O₂-Fraktion 21%, CO₂ 5%, N₂ 74%), hypoxischer (O₂-Fraktion 3%, CO₂ 5%, N₂ 92%) oder anoxischer (O₂-Fraktion <0,1%, CO₂ 5%, N₂ 95%) Umgebung inkubiert. Nach Beendigung des

Experiments wurde das Kulturmedium abgenommen und bei -20°C gelagert. Der Zellrasen wurde einmal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Kulturen, aus denen die Gesamt-RNS isoliert werden sollte, wurden mit 0,7 ml Guanidiniumthiocyanat/Vertiefung der Kulturplatte aufgelöst und bis zur Bearbeitung der RNS bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurden die Zellen mit 1x Zelllysis-puffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega; Heidelberg) aufgelöst.

2.1.2 HepG2-Zellen

Die humane Hepatomzelllinie HepG2 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC No. HB 8065; Rockville, Maryland, USA) bezogen.

HepG2 ähneln in ihrem Phänotyp und dem Spektrum der von ihnen synthetisierten und sezernierten Proteine fetalnen Hepatozyten (Darlington et al., 1986). In Abhängigkeit vom zellulären Sauerstoffpartialdruck bilden sie Erythropoietin (Wolff et al., 1993). Mit diesem etablierten Zellmodell wurden vergleichende Untersuchungen zur humanen Neuroblastomzelllinie Kelly durchgeführt.

Die Zellkultur wurde wie unter 2.1.1 behandelt, die Versuche und die Aufarbeitung entsprechend durchgeführt.

2.1.3 Ba/F3-Zellen

Die murine Lymphoblastomzelllinie Ba/F3 ist in ihrem Wachstum von Interleukin 3 abhängig. Die von uns benutzten Ba/F3-Zellen wurden uns von Dr. A. d'Andrea, Boston zur Verfügung gestellt. Nach einer stabilen Transfektion exprimieren diese Zellen den Rezeptor für humanes Erythropoietin. Da sie dadurch in Abhängigkeit von der Erythropoietin-Konzentration proliferieren, stellen sie ein geeignetes

Bioassay-System zur Messung der Erythropoietin-Konzentration im Medium von Kelly-Zellen dar.

Ba/F3-Zellen wurden in 75 cm² Flaschen mit RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum, 1% β -Mercaptoethanol und 0,5 E/ml Erythropoietin (Neo Recormon®, 4000 IE Epoetin beta; Roche), als Suspensionskulturen unter den für Kelly-Zellen beschriebenen Bedingungen gezüchtet. Die Zellen wurden für die Versuche auf Mikrotiterplatten à 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One Cellstar®) ausgesät.

2.2 Proteinbestimmung für zelluläres Gesamtprotein

Der Gesamtproteingehalt von Kelly-Zellen aus einer Vertiefung einer Kulturplatte wurde gemessen und das sezernierte Erythropoietin pro mg Gesamtprotein angegeben. Die Zellen wurden am Ende des Versuches wie unter 2.1.1 aufgearbeitet. Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry (Lowry et al., 1951) mit einem Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Absorption der Standard- und der Probenlösungen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (Spectra Count® Microplate Photometer, Packard; Meriden, USA). Anhand der Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.3 Vitalitäts- und Proliferationstest für Zellkulturen: MTT-Test

Der MTT-Test (Hansen et al., 1989) beruht auf der Fähigkeit intakter Zellen, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-bromid) zu Formazan zu reduzieren. Diese Reduktion erfolgt durch mitochondriale und zytoplasmatische

Dehydrogenasen. Proportional zu der Anzahl lebender Zellen ist die Konzentration des farbigen Formazans. Der Test wurde eingesetzt, um die Vitalität und Proliferation der unter 2.1.3 genannten Ba/F3-Zellen zu überprüfen.

Diese wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und in Medium kultiviert, das Erythropoietin in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Außerdem wurden die Ba/F3-Zellen mit Mediumüberständen der Kelly-Zellen aus normoxischen (21% O₂), hypoxischen (3% O₂) und anoxischen (<0,1% O₂) Versuchsreihen inkubiert. Anschließend wurden die Ba/F3-Zellen zwei Stunden mit MTT-Lösung inkubiert, dann lysiert und die Absorption des Formazans bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer bestimmt.

2.4 Messung spezifischer Proteine im Zellkulturüberstand

2.4.1 Enzym-gebundene immunologische Bestimmung von Erythropoietin im Zellkulturüberstand

Die Bestimmung von Erythropoietin wurde mit einem Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (R&D Systems, Inc.; Minneapolis, USA) auf Mikrotiterplatten nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Mikrotiterplatten sind spezifisch mit monoklonalen murinen Antikörpern gegen Erythropoietin besetzt. Jeweils 100 µl einer Probe oder des Standards wurden in eine Vertiefung pipettiert, mit 100 µl Inkubationspuffer gemischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Aspiration der Lösung aus den Vertiefungen wurden zum Erythropoietin-Nachweis 200 µl eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in jede Vertiefung hinzugefügt. Die Inkubation mit dem Anti-Erythropoietin-Antikörper erfolgte wieder zwei Stunden bei Raumtemperatur. Dann wurde die Platte viermal

mit Waschpuffer gewaschen und schließlich für 20 Minuten 200 µl Substratlösung hinzugegeben. Dieses Chromogen wurde von der Enzymreaktion oxidiert und bildete einen blaugefärbten Komplex. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl Schwefelsäure gestoppt. Die erzeugte Menge des Farbstoffs war direkt proportional zu der Menge an Konjugat, die an den Erythropoietin-Antikörper-Komplex gebunden war und so auch proportional zu der Menge an Erythropoietin in Standard oder Probe. Die Absorption der Probe und der Standards wurde photometrisch bei 450 nm innerhalb von 15 Minuten bestimmt. Die Erythropoietin-Konzentrationen der Proben wurden aus der Standardkurve berechnet.

2.4.2 Bioassay für Erythropoietin mit Ba/F3-Zellen

Die Ba/F3-Zellen wurden wie unter 2.1.3 angegeben kultiviert und für den Versuch in 50 µl Erythropoietin-freiem Medium in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 18 Stunden erhielten die Zellen jeweils 50 µl eines Erythropoietin-Standards bzw. 50 µl Medium aus den Überständen der Versuche mit den Kelly-Zellen. Die Ba/F3-Zellen wurden dann für 48 und 72 Stunden unter Standardbedingungen gezüchtet. Die Proliferation der Zellen wurde mit dem MTT-Test untersucht (2.3) und die Erythropoietin-Konzentration aus der Standardkurve errechnet.

2.5 Isolation der Gesamt-RNS aus Zellkulturen mit saurem Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol

Die Gesamt-RNS aus Zelllysaten wurde nach der zuerst von Chomczynsky und Sacchi (1987) beschriebenen Methode isoliert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit zellulärer Bestandteile in organischen oder

wässrigen Lösungsmitteln. Proteine lösen sich in organischen Lösungsmitteln, hier Phenol, während die RNS nur in der wässrigen Phase löslich ist. Durch Ansäuerung verbleibt die DNS aufgrund ihrer Histonproteine in der organischen Phase bzw. aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen an der Phasengrenze zwischen organischer und wässriger Lösung. Das Originalprotokoll von Chomczynsky wurde für ein Zellhomogenatvolumen von 700 µl in GTC adaptiert. Dieses wurde mit 560 µl Phenol, pH 4,5 und 280 µl Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol im Verhältnis 25: 24: 1 (beide Lösungen von Sigma) sowie 70 µl 2 M NaOAc, pH 4,0 in einem 2,0 ml Eppendorfcap gemischt. Der Ansatz wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000 rpm, 4°C, 30 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5415 D; Hamburg). Die obere wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation abgenommen, in ein neues 1,5 ml Eppendorfcap überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol (J.T. Baker; Deventer, Holland) versetzt. Die RNS präzipitierte für eine Nacht bei -20°C und wurde wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das abzentrifugierte RNS-Präzipitat wurde in 300 µl GTC resuspendiert, ein zweites Mal mit 300 µl Isopropanol gefällt und erneut bei -20°C über eine Nacht eingefroren. Schließlich wurde das Präzipitat 25 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen sowie das Präzipitat mit 75% Ethanol (J.T. Baker; Deventer, Holland) gewaschen und getrocknet. Die RNS wurde durch Erwärmung für fünf Minuten auf 60°C in 15-20 µl DEPC 0,1% aqua dest. gelöst.

2.6 Bestimmung der RNS-Konzentration

Der Gesamt-RNS-Gehalt einer RNS-Lösung wurde durch Messung im UV-Spektrometer bei 260 nm bestimmt. Da Nukleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum haben (Sambrook et al., 1989), wurde eine 1: 100 Verdünnung der RNS-Lösung in aqua dest. hergestellt und mit einem

Spektralphotometer (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einem RNS-Gehalt von 40 µg/ml.

OD = Optische Dichte

Die RNS-Konzentration errechnet sich nach der Formel:

$$\text{RNS } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{OD}_{260} * 40 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^3$$

Da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen, konnte durch zusätzliche Bestimmung der Absorption bei 280 nm der Verunreinigungsgrad der RNS-Präparation durch Proteine bestimmt werden. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ liegt für eine gute RNS-Präparation zwischen 1,8 und 2,0.

2.7 Nachweis spezifischer mRNS

2.7.1 Reverse Transkription der mRNS in cDNS

Mit der reversen Transkriptase (RT) eines Mäuseleukämievirus (M-MLV Reverse Transkriptase, Promega; Madison WI, USA) wurde von den RNS-Präparationen aus den Zellkulturen 1 µg Gesamt-RNS in cDNS umgeschrieben. 2,5 µl Oligo dT (0,2 µg/µl Invitrogen; USA), das an die Poly-Adenosin-Sequenz, ein charakteristisches Merkmal der mRNS, bindet, wurden als Startermolekül eingesetzt. RNS und Oligo dT wurden gemischt und zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNS für 10 Minuten auf 68°C erhitzt. Um ein Renaturieren der RNS zu verhindern, wurde der Ansatz anschließend sofort auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurden auf Eis fünf Einheiten Reverse Transkriptase, 0,4 mM NTPs sowie 5x Reaktionspuffer (alles Promega) hinzugefügt. Die Synthese der cDNS wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 90 Minuten bei 45°C, 30 Minuten bei 52°C und 15 Minuten bei 96°C durchgeführt.

2.7.2 Qualitative Darstellung der Erythropoietin-mRNS mittels PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht es, den DNS-Gehalt einer Probe exponentiell zu vermehren. Diese Methode gestattet die Detektion auch sehr geringer Mengen einer bestimmten mRNS, wenn diese wie unter 2.7.1 beschrieben vorher in cDNS umgeschrieben wurde. Da bei der PCR DNS exponentiell vermehrt wird, beeinflussen geringe Unterschiede in der Effizienz der PCR die Produktausbeute. Daher ist die Menge an spezifischer cDNS am Ende der PCR nicht immer proportional zur Ausgangsmenge an spezifischer cDNS. Aussagen über die Ausgangsmenge sind deshalb nur bedingt möglich.

Die PCR wurde in 0,1 mM von jedem NTP (Promega; Madison WI, USA), 20 pmol von jedem Primer, 0,75 mM $MgCl_2$, PCR-Puffer (1x) und 0,75 Units Taq Polymerase (alles Invitrogen; USA) in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt. Nach initialer Denaturierung bei 96°C für drei Minuten erfolgte die Reaktion für 29-33 Zyklen wie folgt: 96°C, eine Minute; 60°C, eine Minute 30 Sekunden und 72°C drei Minuten.

Die Erythropoietin-mRNS wurde auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (s. Abb. 2.1).

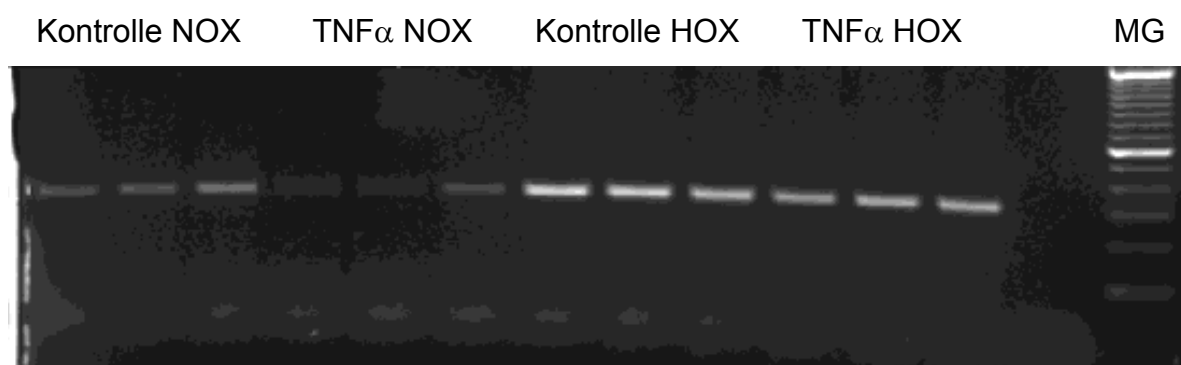


Abb. 2.1: 1% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, Erythropoietin-mRNS in HepG2 unter UV-Licht visualisiert (n = 3), MG = Molekulargewichtsstandard

2.7.3 Quantifizierung der Genexpression mittels real-time PCR (RT-PCR)

Um die unter 2.7.2 erwähnte Schwierigkeit bei der Quantifizierung von mRNA zu vermeiden, wurde die cDNA mithilfe der real-time PCR quantifiziert. Idealerweise sollte es mit jedem PCR-Zyklus zu einer Verdoppelung der cDNA und so zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen PCR-Produktes kommen. Hiervon unterscheidet sich jedoch die normale Reaktionskinetik der PCR: nur in den mittleren Zyklen der PCR wird ein exponentieller Produktzuwachs beobachtet, während das Produkt in den frühen Zyklen nicht eindeutig nachzuweisen ist und in den späten Zyklen der PCR ein Plateau erreicht wird, so dass bei steigender Zyklenzahl kein Zuwachs mehr erkennbar ist. Das Erreichen des Plateaus ist von der Ausgangsmenge abhängig und wird demnach früh bei hoher Ausgangsmenge und spät bei niedriger Ausgangsmenge erreicht. Aus der Plateauphase einer Reaktion kann folglich kein Rückschluss mehr auf die Ausgangsmenge der PCR gezogen werden. Dies ist nur in der exponentiellen Phase der PCR zulässig.

Bei der real-time PCR wurden für jede einzelne PCR-Probe die verschiedenen Reaktionsphasen bestimmt. Dies erfolgte über den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in die neu synthetisierte cDNA. Nach jedem PCR-Zyklus wurde SYBR-Green mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Intensität der Fluoreszenz photometrisch bestimmt. Für jede einzelne Reaktion erhielt man so die Amplifikationskurve der frühen nicht-linearen Phase, der exponentiellen Phase und der Plateauphase. Eine exponentielle Fluoreszenzzunahme entsprach einem exponentiellen Produktzuwachs.

Es wurden Standards bekannter Konzentrationen benutzt, um die absolute cDNA-Menge einer Probe zu bestimmen. Standards und Proben erreichten unter gleichen Versuchsbedingungen entsprechend ihrer Ausgangsmenge an cDNA nach unterschiedlich vielen Zyklen die exponentielle Phase der PCR. Anschließend wurde nun ein Schwellenwert festgelegt, der alle Amplifikationskurven der Standards und Proben in der exponentiellen Phase schneidet,

um den cDNS-Gehalt einer Probe zu bestimmen. Für jede Standardkonzentration wurde die Zykluszahl ermittelt, bei der der Schwellenwert erreicht worden war und die Quantifizierung der cDNS einer einzelnen Probe errechnete sich aus der Anzahl der Zyklen, die nötig waren, diesen Schwellenwert zu erreichen.

2.7.3.1 Quantifizierung der Erythropoietin-mRNS und der mRNS für das ribosomale Protein S18

Die RT-PCR wurde mit 41 µl Aqua dest., 50 µl PCR-Puffer (2x), 3 µl SYBR green, 2 µl vom 5'-und 3'- EPO-Primer und 2 µl cDNS in einem Volumen von 100 µl (dreifache Bestimmung) mit je 25 µl Reaktionsgemisch durchgeführt. Nach initialer Denaturierung bei 50°C für 2 Minuten und 95°C für 10 Minuten erfolgte die Reaktion 40 Zyklen lang wie folgt: 95°C, 15 Sekunden; 60°C, 1 Minute.

Die Quantifizierung für das ribosomale Protein S18 erfolgte wie oben für Erythropoietin beschrieben. Es wurden entsprechende Primer für ribosomales Protein S18 benutzt sowie die Reaktion auf 45 Zyklen verlängert. Außerdem erfolgte der letzte Schritt bei 62°C. Das ribosomale Protein S18 dient als Vergleichswert für in den Zellen konstant gebildete RNS.

2.8 Präparation DNS-bindender Proteine aus der Zytoplasma- und der Kernfraktion von Kelly- und HepG2-Zellen

Nach einem Protokoll von Schreiber und Mitarbeitern (Schreiber et al., 1989) wurde die Isolation von DNS-bindenden Proteinen durchgeführt. Nach Versuchsende und Abnahme des Versuchsmediums auf Eis wurden die Kelly- und die HepG2-Zellen einmal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun

auf Eis mit 100 µl Lysispuffer A (s. Anhang) pro Platte mit einem Durchmesser von 9,4 cm behandelt, die Zellen von der Petrischale mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfcap überführt. Anschließend wurde die Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Zelllysate wurden dann durch Zentrifugation mit 5000 rpm, bei 4°C für 5 Minuten die Zellkerne und die Membranfraktion von der Zytoplasmafraktion getrennt. Der Überstand mit der Zytoplasmafraktion wurde abpipettiert und bei –20°C eingefroren. Das Präzipitat, bestehend aus Zellkernen und Membranfraktion, wurde mit 40 µl Lysispuffer B (s. Anhang) resuspendiert und für 30 Minuten mit einem Magnetrührer auf Eis homogenisiert, um die Zellkernmembranen aufzuschließen und die Proteine von der DNS zu lösen. Durch erneute Zentrifugation mit 12000 rpm bei 4°C für 15 Minuten konnte der die Kernproteine enthaltende Überstand gewonnen, abgenommen und bei –20°C eingefroren werden.

2.9 Bestimmung des Proteingehalts in Zellkern- und Zytoplasma

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry (Lowry, 1951) wie unter 2.2 beschrieben durchgeführt.

2.10 Western-Blot

2.10.1 Western-Blot für den Transkriptionsfaktor HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α wurde in den Kernextrakten von Kelly-Zellen nachgewiesen. In einem Polyacrylamidgel (Trenngel 7,5%; Sammelgel 5%) wurden 25 µg geladene Kernproteine elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard wurde ein Molekulargewichtsmarker (Sigma; St Louis, Missouri, USA) eingesetzt

und die Elektrophorese mit 120 Volt für eine Stunde und 30 Minuten durchgeführt (Bio-Rad Power Pac 3000). Anschließend wurden die aufgetrennten Kernproteine in Blotpuffer bei 110 V eine Stunde und 10 Minuten unter Eiskühlung auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell Inc.; Keene, USA) geblottet. Im Anschluß wurde mit einer Ponceau-Rot-Färbung der Membranen der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membranen gezeigt, die Membranen mit TBS-T für zwei Minuten gewaschen und über Nacht mit 5% Magermilchlösung bei 4°C blockiert.

Nach dreimaligem Waschen für zwei Minuten mit TBS-T wurden die Blot-Membranen mit einem monoklonalen murinen Anti-HIF-1 α -Antikörper 1: 750 (anti-human HIF-1 α AK, Transduction Laboratories; Lexington, USA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (5 ml Inkubationspuffer/Membran) und wieder dreimal mit TBS-T gewaschen. Schließlich wurden die Membranen mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper 1: 10000 (anti-mouse-HRP-linked AK, Sigma), der gegen das Fab-Fragment von Maus-ImmunglobulinG gerichtet ist, bei Raumtemperatur inkubiert (10 ml Inkubationslösung/ Membran).

Vor der Detektion mit der Substratlösung wurden die Membranen abermals mit TBS-T fünfmal für drei Minuten gewaschen und abschließend der Transkriptionsfaktor HIF-1 α auf den Membranen durch Zugabe von Wasserstoffperoxid in den Detektionspuffer visualisiert. Die Darstellung erfolgte durch fünf- bis zehnminütige Exposition der Membranen auf einen Film (Agfa Cronex 5, Medical X-ray Film; Mortsel Belgien) und dessen anschließender Entwicklung.

2.10.2 Western-Blot für den Transkriptionsfaktor HIF-1 β /ARNT1

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 β /ARNT1 wurde in den Kernen der Kelly-Zellen nachgewiesen. Der HIF-1 β /ARNT1-Western-Blot wurde nach gleicher Methode wie unter 2.10.1 erläutert durchgeführt. Die Detektion des Transkriptionsfaktors

HIF-1 β /ARNT1 erfolgte mit einem monoklonalen, murinen Antikörper (anti-human HIF-1 β AK, Transduction Laboratories; Lexington, USA) in einer 1:500 Verdünnung unter den gleichen Bedingungen wie für HIF-1 α beschrieben. Ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, gegen Maus-IgG gerichteter Ziegen-Antikörper wurde als zweiter Antikörper benutzt (anti-mouse-HRP-linked AK, Sigma).

2.10.3 Western-Blot für den Transkriptionsfaktor NF κ B

Der Transkriptionsfaktor NF κ B wurde in den Kernen und im Zytoplasma der Kelly-Zellen nachgewiesen. Der NF κ B -Western-Blot wurde nach gleicher Methode wie unter 2.10.1 erläutert durchgeführt.

Die Detektion von NF κ B erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die p65-Untereinheit von NF κ B (Santa Cruz; California, USA) in einer 1: 500 Verdünnung unter den gleichen Bedingungen wie für HIF-1 α beschrieben. Ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Ziegen-Antikörper wurde als zweiter AK eingesetzt (anti-rabbit-HRP-linked AK, Sigma).

2.10.4 Western-Blot für das Strukturprotein α -Tubulin

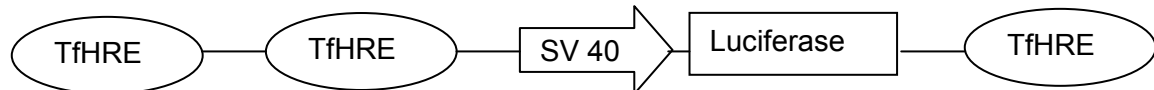
In den Zellkernen und im Zytoplasma der Kelly-Zellen wurde α -Tubulin nachgewiesen. Der α -Tubulin-Western-Blot wurde wie unter 2.10.1 erläutert durchgeführt.

Die Detektion von α -Tubulin erfolgte mit einem monoklonalen, murinen Antikörper (anti-human α -Tubulin AK, Santa Cruz; California, USA) in einer 1: 750 Verdünnung unter den gleichen Bedingungen, wie sie für HIF-1 α beschrieben wurden.

Ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, gegen Maus-IgG gerichteter Ziegen-Antikörper wurde als zweiter Antikörper benutzt (anti-mouse-HRP-linked AK, Sigma).

2.11 Transiente Transfektion des pH3SVL-Plasmids in Kelly-Zellen mittels Elektroporation

Das pH3SVL-Plasmid wurde uns von Prof. R. Wenger, Zürich (Rolfs et al., 1997), zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet das Luciferasereporter gen unter der Kontrolle des SV 40 Promotors und dreier HREs (Hypoxia Responsive Elements) aus dem 5' Enhancer des Transferrings (Tf). HREs des Transferrings bestehen aus jeweils zwei HBSs (HIF Binding Sites):



Aus der Aktivität des Luciferasereporter gens kann man Rückschlüsse auf die transkriptionelle Aktivität der vorangeschalteten Bindungselemente (hier HBS) ziehen.

Die Kelly-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem pH3SVL-Plasmid transient transfiziert. Hierfür wurden die Zellen trypsinisiert, bei 1300 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in ca. 390 µl Serum-freiem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 400 µl Küvette pipettiert, 10 µg des Plasmids hinzugefügt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Küvette leicht aufgeschüttelt, bei 200 Volt, 975 µF, ca. 30-35 msec elektroporiert (Gerät der Firma BioRad) und wieder fünf Minuten auf Eis inkubiert. Mit entsprechender Menge an Serum-haltigen Medium wurde nun die Zellsuspension in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (Greiner Bio-One Cellstar) pipettiert und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Vor

Stimulation der Zellen für 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Nach Versuchsende wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 50 µl Lysispuffer behandelt und bei –20°C über Nacht eingefroren. Schließlich wurden die Lysate unter Schütteln (Heidolph, Titrama 101) 30 Minuten aufgetaut, für fünf Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert und die Überstände, die die gebildete Luciferase enthielten, abgenommen. 70 µl des 1: 3 verdünnten Luciferasesubstrates (Promega; Madison, USA) wurden zu 30 µl der Probe gegeben und die RLUs (Relative Light Units) bezogen auf das Gesamtprotein in mg gemessen.

2.12 Statistische Auswertung

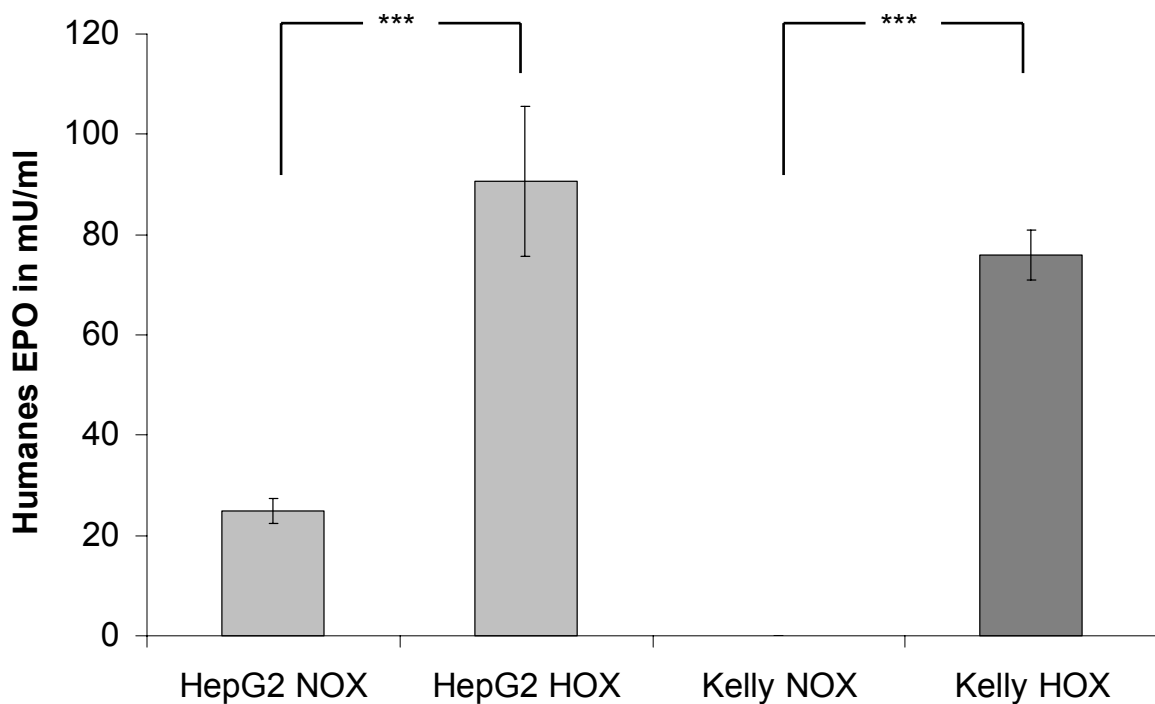
Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Durch den Tukey-Kramer Test wurde die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen Kontrollkulturen und verschieden behandelten Kulturen berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der hypoxischen Induzierbarkeit von Erythropoietin

3.1.1 Nachweis hypoxischer Induzierbarkeit der Erythropoietin-Proteinbildung in HepG2- und Kelly-Zellen mittels eines ELISAs

Zunächst sollte im Überstand hypoxischer und normoxischer Kulturen der Hepatomzelllinie HepG2 und der Neuroblastomzelllinie Kelly das Erythropoietin-Protein mit einem ELISA nachgewiesen werden. Die konfluenten Zellkulturen wurden wie unter 2.1 beschrieben in Kulturplatten mit sechs Vertiefungen (Greiner Bio-One Cellstar[®]) ausgesät und nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen in normoxischer (21% O₂) oder hypoxischer (3% O₂) Umgebung inkubiert.



In Abb. 3.1 wird deutlich, dass die Bildung von Erythropoietin in beiden Zelllinien abhängig ist vom Sauerstoffpartialdruck ihrer Umgebung und durch Hypoxie gesteigert werden kann. Bei den HepG2 erfährt die mittlere Erythropoietin-Produktion, die unter normoxischen Bedingungen bereits bei einem Wert von $24,8 \pm 2,4$ mU/ml liegt, eine hypoxische Stimulation um das 3,7fache. Die Neuroblastomzellen bleiben im normoxischen Bereich unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs, während die Werte für Erythropoietin unter Hypoxie auf $75,9 \pm 4,9$ mU/ml ansteigen.

3.1.2 Nachweis hypoxischer Induzierbarkeit von Erythropoietin-mRNS in HepG2- und Kelly-Zellen mittels qualitativer PCR

Unter gleichen Versuchsbedingungen wie in 3.1.1 beschrieben wurden Kulturen, aus denen die Gesamt-RNS isoliert werden sollte, inkubiert. Anschließend wurden sie wie unter 2.1 beschrieben lysiert und die Gesamt-RNS isoliert. Die Reverse Transkription der mRNS in cDNS und qualitative Darstellung der Erythropoietin-mRNS erfolgte mittels PCR.

Die Agarose-Gele in Abb. 3.2 zeigen einen geringen Gehalt der Erythropoietin-Expression auf mRNS-Ebene in den Hepatomzellen unter Normoxie sowie nach hypoxischer Inkubation für 24 Stunden eine deutliche Steigerung des Erythropoietin-mRNS-Gehaltes. Die Kelly-Zellen zeigen ebenfalls unter Hypoxie bereits nach drei Stunden eine Stimulation der Erythropoietin-mRNS, die sich nach 24 Stunden weiter verstärkt hat. Unter normoxischen Bedingungen und nach einstündiger Hypoxie ist keine Erythropoietin-mRNS nachweisbar.

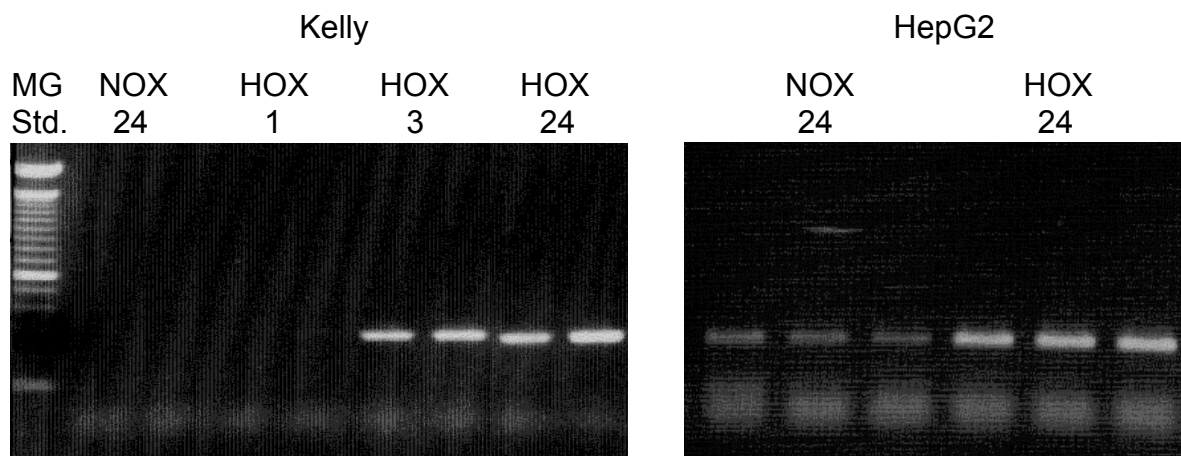


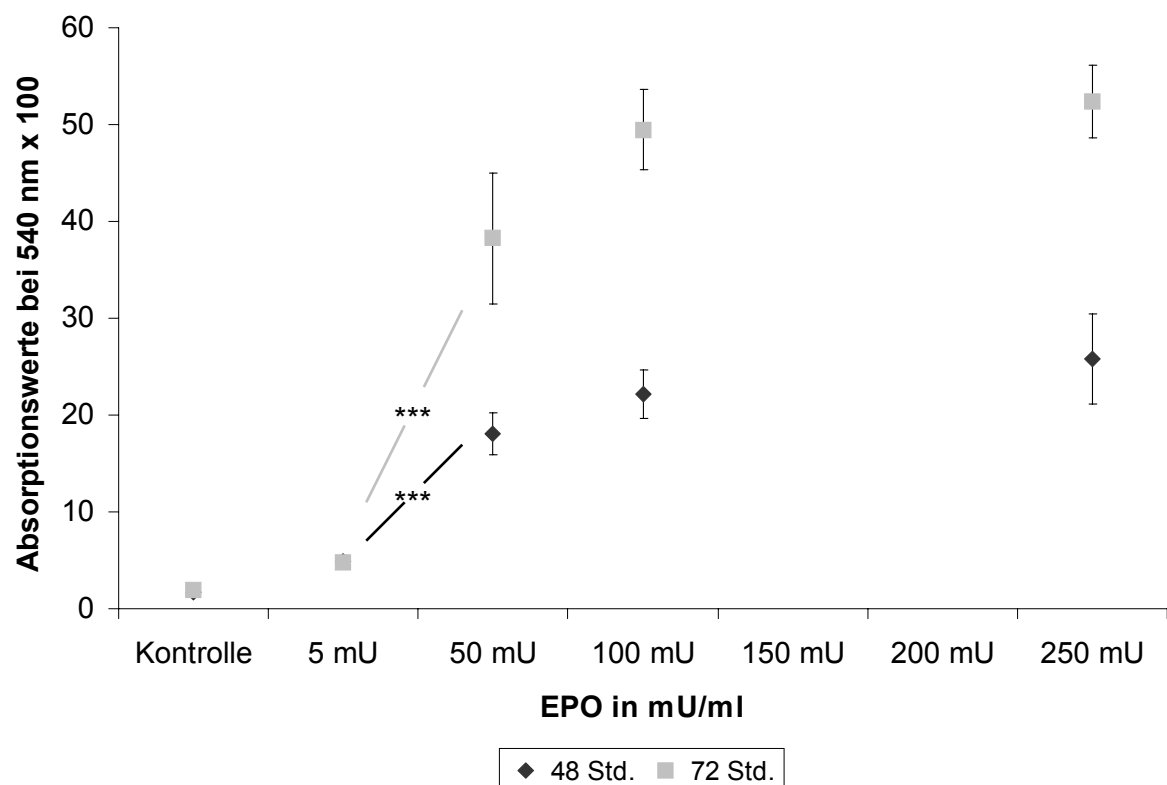
Abb. 3.2: Agarose-Gel mit DNS-Amplifikationsprodukten der EPO-cDNA nach PCR. PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert (Kelly n = 2, HepG2 n = 3)

3.2 Nachweis der biologischen Aktivität des Erythropoietins mithilfe des Ba/F3-Bioassays

3.2.1 Proliferationsverhalten der Ba/F3-Zellen unter verschiedenen Erythropoietin-Standards gemessen durch einen MTT-Test

Die Ba/F3-Zellen sind stabil mit dem humanen Erythropoietin-Rezeptor transfiziert und proliferieren in Abhängigkeit von der Erythropoietin-Konzentration im Medium. Die Ba/F3-Zellen wurden wie unter 2.1.3 angegeben kultiviert und für den Versuch in 50 μ l Erythropoietin-freiem Medium in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 18 Stunden erhielten die Zellen jeweils 50 μ l eines Erythropoietin-Standards. Die Ba/F3-Zellen wurden dann für 48 und 72 Stunden unter Standardbedingungen gezüchtet. Die Proliferation der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Proliferationskurve der Ba/F3-Zellen in Abb. 3.3 nach 48 Stunden veranschaulicht eine deutliche Steigerung der Zellproliferation ab einer Erythropoietin-Konzentration von 5 mU/ml.

Die Zahl der vitalen Zellen bezogen auf den bei einer Erythropoietin-Konzentration von 250 mU/ml Medium gemessenen Proliferationswert steigt hier von 19,5% bei 5 mU Erythropoietin/ml Medium auf 71,8% bei 50 mU/ml Medium an, während zwischen 0 und 5 mU Erythropoietin/ml Medium die Überlebensrate nicht signifikant zunimmt. Im Bereich der Erythropoietin-Konzentration von 100 bis 250 mU/ml stellt sich ein Plateau der Proliferation ein.



Ebenfalls wird in Abb.3.3 deutlich, dass auch nach 72 Stunden Inkubationszeit im Bereich bis 5 mU Erythropoietin/ml Medium keine Proliferation der Ba/F3-Zellen zu beobachten ist. Jedoch zeigt sich eine signifikant höhere Überlebensrate bei 50 mU Erythropoietin/ml Medium auf mehr als das Doppelte der nach 48 Stunden gemessenen Zunahme der Zellzahl. Diese Steigerung setzt sich noch unter 100 mU Erythropoietin/ml Medium fort und erreicht ebenfalls bei einer Erythropoietin-Konzentration von 250 mU/ml ein Plateau, das aber einer mehr als doppelt so hohen Zellzahl bezogen auf den 48 Stunden-Wert entspricht.

3.2.2 Proliferationsverhalten der Ba/F3-Zellen unter verschiedenen Medium-überständen aus Versuchen mit Kelly-Zellen

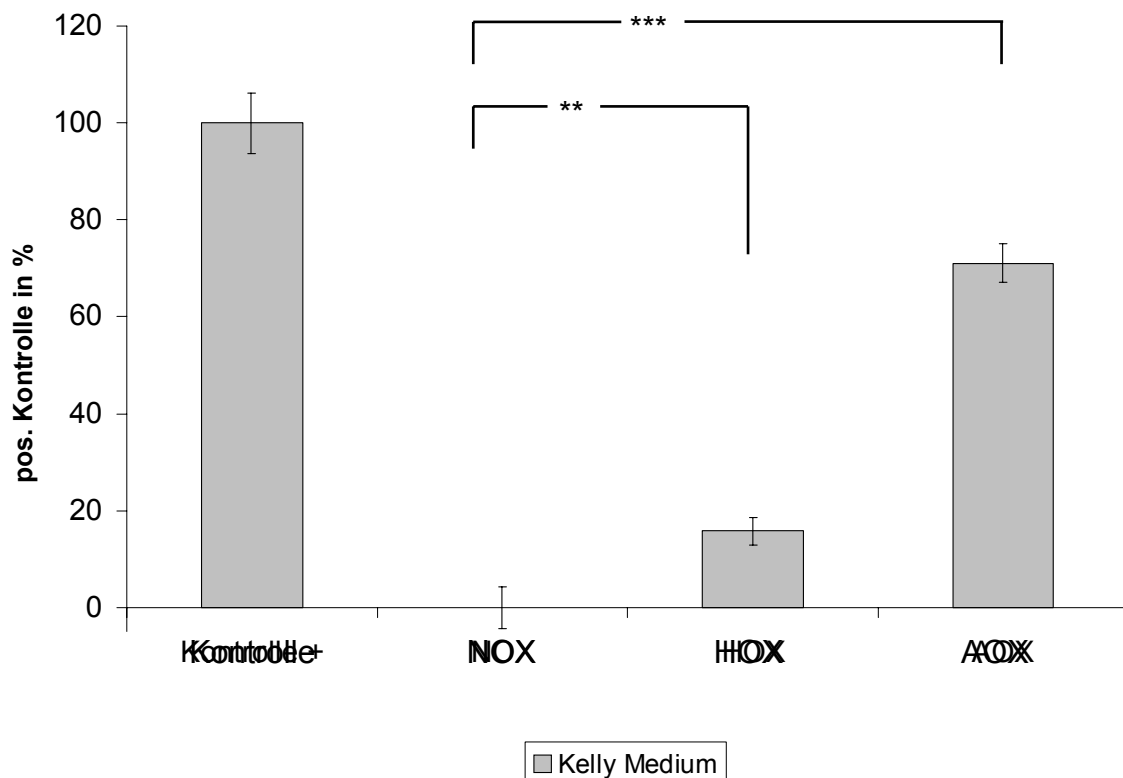
Die Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurde wie unter 2.1 beschrieben kultiviert und im konfluenten Zustand in Petrischalen (Greiner Bio-One Cellstar[®]) überführt. Nach einem Mediumwechsel nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen unter normoxischen, hypoxischen (3% O₂) und anoxischen (<0,1% O₂) Bedingungen (s. 2.1) für weitere 24 Stunden. Der Mediumüberstand wurde dann für die Ba/F3-Zellen gewonnen.

Der Ba/F3-Bioassay wurde wie unter 3.2.1 angegeben durchgeführt. Nach 18 Stunden erhielten die Zellen jeweils 50 µl Medium aus den Überständen der Versuche mit den Kelly-Zellen (konditioniertes Medium). Die Ba/F3-Zellen wurden dann für 48 sowie für 72 Stunden unter Standardbedingungen gezüchtet. Die Proliferation der Zellen wurde mit dem MTT-Test untersucht. Die Inkubation der Ba/F3-Zellen mit den Mediumüberständen der Neuroblastomzellen für 72 Stunden führte zu einem großen Teil abgestorbener Ba/F3-Zellen.

Die Inkubation der Ba/F3-Zellen mit konditioniertem Medium für 48 Stunden dagegen belegte die biologische Wirkung des von den Kelly-Zellen sezernierten Erythropoietins (Abb. 3.4). Die mit 250 mU Erythropoietin/ml Medium behandelten

Zellen wurden als Positivkontrolle mit 100% festgesetzt und die Effekte des konditionierten Mediums auf diesen Wert bezogen.

Das Wachstum der Ba/F3-Zellen stagniert nach Behandlung mit konditioniertem Medium von normoxischen Kelly-Zellen etwa so, wie es bei BaF/3-Zellen zu beobachten war, die mit Erythropoietin-freiem Medium behandelt wurden. Im Vergleich hierzu steigt die Zahl der vitalen Zellen unter Einfluß des Mediums hypoxischer und anoxischer Kelly-Zellen signifikant an.



3.3 Bildung von Erythropoietin in der Neuroblastomzelllinie Kelly nach Behandlung mit Zytokinen sowie einem NO-Donor

3.3.1 Bestimmung des in den Kulturüberstand sezernierten Erythropoietins mittels eines EPO-ELISAs

Der Versuch wurde wie unter 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Behandlung der Kelly- und HepG2-Zellen mit IL-1 β und TNF α sowie dem NO-Donor S-Nitroso-glutathion (GSNO) fand 24 Stunden nach Aussaat der Zellen auf Kulturplatten mit sechs Vertiefungen statt. Für die beiden Zelllinien wurde nach 24stündiger Inkubation unter Hypoxie (3% O₂) das sezernierte Erythropoietin gemessen.

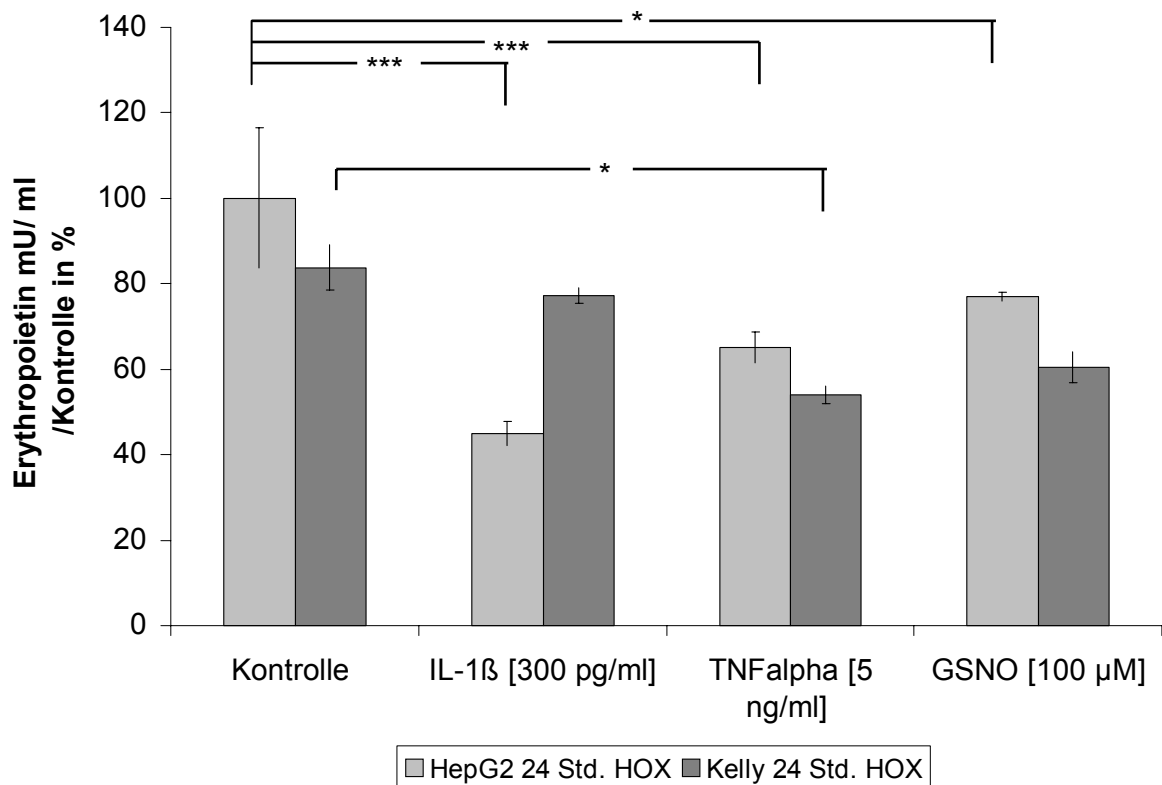
Die Bestimmung der Expression von Erythropoietin und Sekretion in den Kulturüberstand ist in Tabelle 3.1 dargestellt, und in Abb. 3.5 sind die Ergebnisse im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle der HepG2-Zellen angegeben.

Tab. 3.1				
Erythropoietin-Konzentration in mU/ml				
Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3)				
	Kontrolle	IL-1 β	TNF α	GSNO
HepG2 Hypoxie	90,6 \pm 14,9	40,8 \pm 2,7	59 \pm 3,3	69,7 \pm 1
Kelly Hypoxie	75,9 \pm 4,9	69,9 \pm 1,6	48,9 \pm 1,9	54,7 \pm 3,3

Die Erythropoietin-Expression in den HepG2 erfährt ihre stärkste Hemmung während der Inkubation mit IL-1 β . Sie sinkt auf 45% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ab, hingegen hat dieses Zytokin in den Neuroblastom-Zellen eine nicht signifikante Reduktion zur Folge.

TNF α inhibiert die Erythropoietin-Produktion in den Kelly-Zellen signifikant um mehr als ein Drittel. Die Verminderung in den Hepatomzellen unter Zugabe von TNF α liegt bei 34,9%. Unter dem Einfluß des NO-Donors GSNO reduziert sich das im Überstand der HepG2-Zellen gemessene Erythropoietin um 23%. Eine nicht signifikante Inhibition des sezernierten Erythropoietins läßt sich auch in der Neuroblastomzelllinie nachweisen.

Im Vergleich der Zelllinien zeigt sich bei den Hepatomzellen die größte Beeinflussung unter IL-1 β Gabe, jedoch in den Neuroblastomzellen unter TNF α .



3.3.2 Detektion von Erythropoietin-mRNS in HepG2 und Kelly mittels RT-PCR

Wie in 3.1.1 beschrieben wurden die Hepatom- und Neuroblastomzellen, aus denen die Gesamt-RNS isoliert werden sollte, inkubiert. Die Behandlung der Kelly- und HepG2-Zellen mit IL-1 β und TNF α sowie GSNO wurde wie unter 3.3.1 angegeben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.1 beschrieben lysiert und die Gesamt-RNS nach 2.5 isoliert. Die Bestimmung der RNS-Konzentration erfolgte nach 2.6 sowie die Reverse Transkription der mRNS in cDNS nach 2.7. Die mRNS für Erythropoietin und für das ribosomale Protein S18 wurde für beide Zelllinien nach 24stündiger Inkubation unter Hypoxie (3% O₂) mittels RT-PCR nachgewiesen.

Tabelle 3.2 veranschaulicht die Ergebnisse der RT-PCR beider Zelllinien. Um die Expression der Erythropoietin-mRNS darzustellen, wurde der Quotient aus Erythropoietin-mRNS und der mRNS für ribosomales Protein S18 x 100 gebildet. In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle der HepG2-Zellen angegeben.

Tab. 3.2

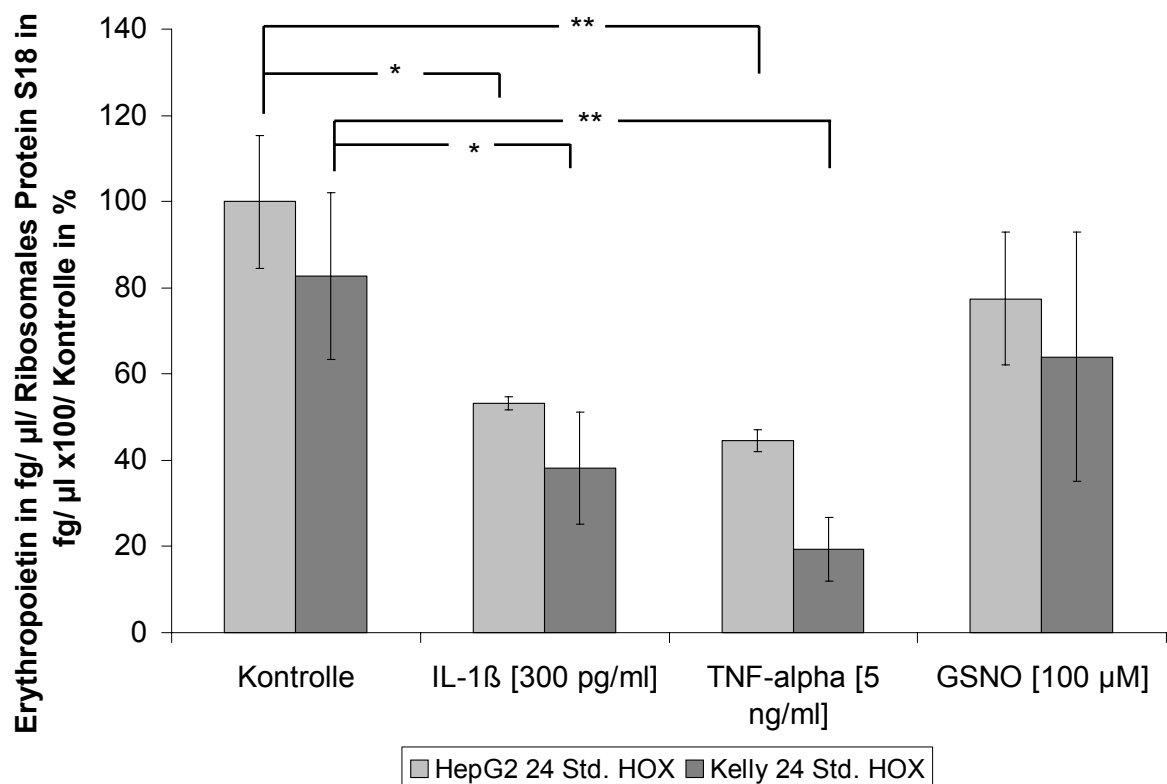
Erythropoietin-mRNS in fg/ μ l/Ribosomales Protein S18-mRNS in fg/ μ l x 100
Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3, jeweils Dreifachbestimmung)

	Kontrolle	IL-1 β	TNF α	GSNO
HepG2 Hypoxie	62 \pm 9,5	33 \pm 1	27,7 \pm 1,5	48 \pm 9,5
Kelly Hypoxie	51,3 \pm 12	23,7 \pm 8	12 \pm 4,6	39,7 \pm 17,9

Auch auf Ebene der mRNS haben die Zytokine und GSNO einen inhibierenden Einfluss. Die Expression der Erythropoietin-mRNS wird in beiden Zelllinien unter dem Einfluss von TNF α signifikant am stärksten gehemmt. Sie sinkt in den

HepG2 um 55,4% und in den Kelly-Zellen um 76,6% bezogen auf den Kontrollwert.

Während der Inkubation mit IL-1 β reduziert sich in den Hepatomzellen die Produktion der Erythropoietin-mRNS um 46,8% bezogen auf die Kontrolle. Die Neuroblastomzellen weisen eine Hemmung unter IL-1 β von 53,9% auf. Unter Zugabe des NO-Donors GSNO zu den Zelllinien beträgt die Verminderung der Erythropoietin-mRNS in den HepG2-Zellen 22,6%; die Neuroblastom-Zelllinie Kelly zeigt eine Reduktion der transkribierten Erythropoietin-mRNS um 22,7% jeweils Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



3.4 Zeitverlauf der Expression von Erythropoietin-mRNS nach Behandlung der Neuroblastomzelllinie Kelly mit $\text{TNF}\alpha$ und GSNO unter hypoxischer Inkubation

Die Expression der Erythropoietin-mRNS wird in beiden Zelllinien unter dem Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ am stärksten gehemmt (s.3.3.2). Ebenfalls waren insbesondere zwischen 4- und 24-stündiger Wirkung von NO in HepG2-Zellen signifikante Unterschiede zu beobachten (Genius und Fandrey, 2000). Daher ist es notwendig, Untersuchungen mit verschiedenen Inkubationsdauern durchzuführen.

Die Neuroblastomzellen, aus denen die Gesamt-RNS isoliert werden sollte, wurden sechs und sechzehn Stunden wie in 3.1.1 beschrieben inkubiert. Die Behandlung der Kelly-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und GSNO wurde wie unter 3.3.1 angegeben durchgeführt und die mRNS isoliert (s.3.3.2). Die mRNS für Erythropoietin und für ribosomales Protein S18 wurde für die Neuroblastom-Zelllinie nach hypoxischer Inkubation (3%) mittels RT-PCR nachgewiesen.

Tabelle 3.3 verdeutlicht, dass $\text{TNF}\alpha$ nach sechs und auch nach 16 Std. die Erythropoietin-mRNS-Expression um 57% (nicht signifikant (n. s.)) bzw. 47,7% (n. s.) senkt. Der Einfluß von GSNO vermag dies nach sechs Std. nur um 21%, während nach 16 Std. Erythropoietin-mRNS sogar leicht erhöht nachweisbar ist (9% n. s.).

Tab. 3.3			
Erythropoietin-mRNS in fg/ μl /Ribosomales Protein-mRNS S18 in fg/ μl x 100 Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 4, jeweils Dreifachbestimmung)			
	Kontrolle	$\text{TNF}\alpha$	GSNO
Kelly 6 Std. Hypoxie	3,98 \pm 1,08	1,71 \pm 1,09	3,14 \pm 0,93
Kelly 16 Std. Hypoxie	7,96 \pm 4,08	4,16 \pm 3,27	8,68 \pm 5,14

3.5 Detektion des Transkriptionsfaktors HIF-1 an Zellextrakten mittels Western-Blot

3.5.1 Nachweis hypoxischer Akkumulation von HIF-1 α in den Kernen der Kelly-Zellen im Vergleich zu den HepG2

Nach Feststellung der Effekte auf die Erythropoietin-Bildung sollte die hypoxische Wirkung auf die Akkumulation von HIF-1 untersucht werden. Dazu wurden an Zellextrakten Western-Blots für die HIF-1 α - und die HIF-1 β -Untereinheit durchgeführt. Analog zu dem von Hepatomzellen bekannten Zeitgang der hypoxischen Akkumulation erfolgten die Inkubationen mit den Neuroblastomzellen.

Die konfluenten Zellkulturen wurden wie unter 2.1 beschrieben in Petrischalen mit Gas-durchlässigem Boden aus hydrophilem FEP-Teflon (Greiner Bio-One Cellstar) ausgesät und nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen in normoxischer und hypoxischer (3% O₂) Umgebung für vier Stunden inkubiert. Die Präparation und Isolation der DNS-bindenden Proteine wurde wie in 2.8 beschrieben durchgeführt. Es folgten die Proteinbestimmung (2.9) und die Western-Blot Analyse (2.10.1).

Die Akkumulation von HIF-1 α in den Kernen beider Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen ist in Abb. 3.7 dargestellt. In den HepG2 kommt es wie bereits vorbeschrieben (Wang et al., 1995) unter Hypoxie zu einer verstärkten Akkumulation von HIF-1 α . Auch in den Kelly-Zellen ist dieses Verhalten zu beobachten.

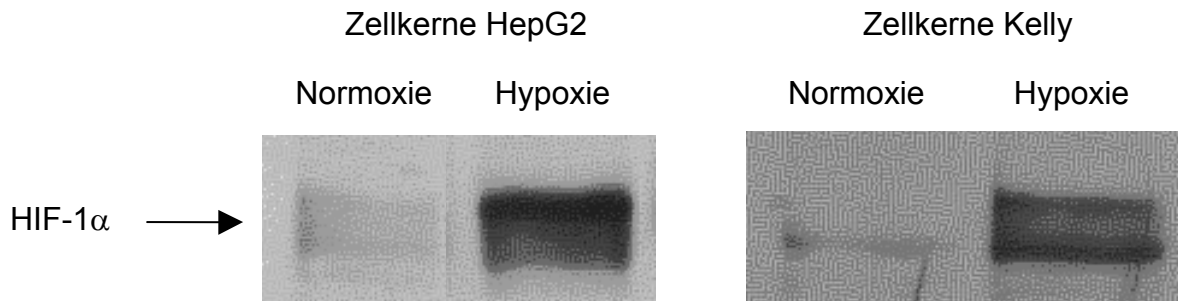


Abb. 3.7: Detektion von HIF-1 α durch Western-Blot Analysen in den Kernen der HepG2- und der Kelly-Zellen. Die Versuche wurden vier Std. unter Normoxie und Hypoxie 3% durchgeführt. Spur 1+2 zeigt HIF-1 α in den Hepatomzellen, Spur 3+4 HIF-1 α in den NB-Zellen.

3.5.2 Nachweis der Wirkung inflammatorischer Zytokine und von NO auf die hypoxische Akkumulation von HIF-1 in den Kelly-Zellen

Im Anschluß an den Nachweis hypoxischer Induzierbarkeit der HIF-1 α -Untereinheit in Kelly-Zellen folgten Untersuchungen zur Wirkung von Zytokinen und NO unter Hypoxie. Die Neuroblastomzellen wurden für vier Stunden analog zu dem von Hepatomzellen bekannten Zeitgang inkubiert (s. 3.5.1) und zusätzlich mit Interleukin-1 β , Tumor Nekrose Faktor α und S-Nitrosoglutathion behandelt. An Zellextrakten wurden Western-Blots für die HIF-1 α - und die HIF-1 β /ARNT1-Untereinheit durchgeführt (2.8-2.10.2).

Das Ergebnis der durchgeführten Western-Blot Analysen zeigt Abb. 3.8. Die Zellextrakte sind in eine Zytoplasma- und eine Zellkernfraktion aufgetrennt worden. Im Zytoplasma erfolgt sowohl bei der hypoxischen Kontrolle als auch unter Einfluß der Zytokine nur eine sehr schwache Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit. Gleiches Verhalten diesbezüglich ist von den Hepatomzellen bekannt. ARNT1 wird konstitutiv auch unter Behandlung mit den Versuchsreagenzien gebildet.

In den Kernextrakten der Kelly-Zellen ist ARNT1 ebenfalls konstitutiv nachweisbar. HIF-1 α weist bei Zugabe von IL-1 β und GSNO eine verstärkte Akkumulation im Kern auf, was eine Parallele zu HepG2-Versuchen darstellt. Jedoch ändert der Einfluss von TNF α nichts am Akkumulationsverhalten von HIF-1 α im Kern im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle. Dies ist ein großer Unterschied zu den Hepatomzellen HepG2, in denen unter IL-1 β und TNF α eine vermehrte Akkumulation von HIF-1 α detektiert wird (Hellwig-Bürgel et al., 1999).

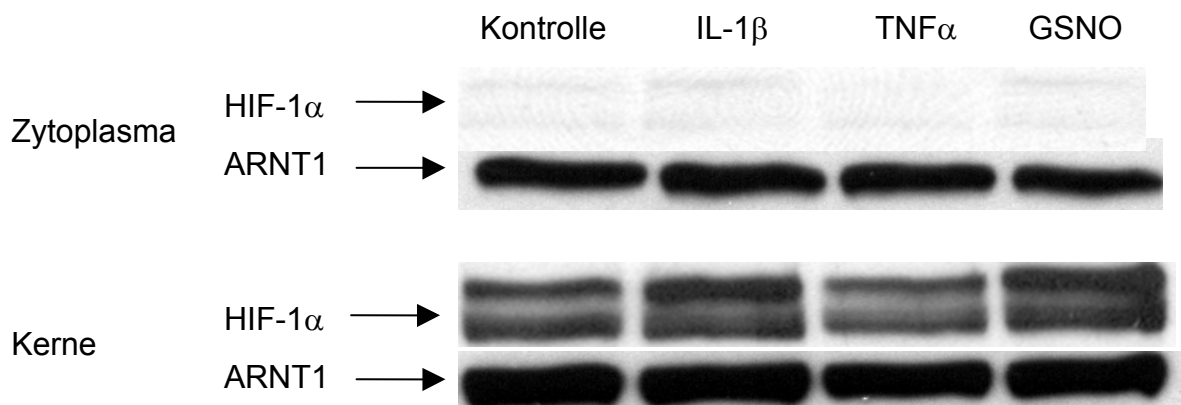


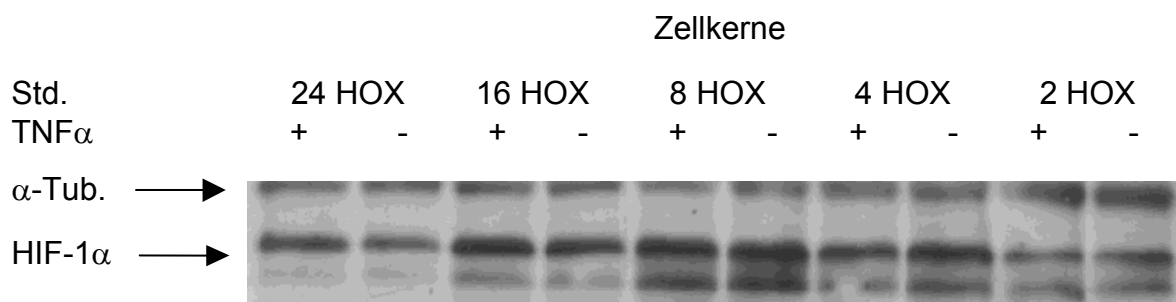
Abb. 3.8: Detektion von HIF-1 α und ARNT1/HIF-1 β durch Western-Blot Analysen in der NB-Zelllinie Kelly. Unter Zugabe von IL-1 β , TNF α und GSNO wurden die Versuche vier Std. in Hypoxie 3% durchgeführt. Die obere Hälfte zeigt jeweils die Zytoplasma-, die untere Hälfte der Abb. die Kernfraktion.

3.5.3 Nachweis der Wirkung von TNF α auf die hypoxische Akkumulation von HIF-1 α in den Kelly-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Kelly-Zellen reagierten bei unseren Western-Blot Analysen (s.3.5.2) unter TNF α Einfluss nicht wie von den HepG2 bekannt mit einer verstärkten Akkumulation von HIF-1 α im Kern. Daher wurden nun Beobachtungen des

Akkumulationsverhaltens von HIF-1 α nach TNF α Behandlung über verschiedene hypoxische Inkubationszeiträume notwendig. Für diese Versuche wurden die Neuroblastomzellen für zwei, vier, acht, sechzehn und vierundzwanzig Stunden bei 3% O₂ inkubiert und mit TNF α behandelt. An Zellkernextrakten wurden Western-Blots für die HIF-1 α - Untereinheit durchgeführt.

Ein repräsentatives Ergebnis der drei nach unabhängigen Experimenten durchgeführten Western-Blot Analysen zeigt Abb. 3.9. Der Einfluss von TNF α ändert nichts am Akkumulationsverhalten von HIF-1 α im Kern im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle. Es ist ersichtlich, dass HIF-1 α über den Zeitverlauf zunächst vermehrt in den Zellkernen der Kelly-Zellen zu detektieren ist. Besonders deutlich wird diese Zunahme nach zwei und vier Stunden und erreicht nach acht Stunden ihr Maximum, während HIF-1 α nach sechzehn und vierundzwanzig Stunden weniger stark nachweisbar ist. Zu allen ausgesuchten Zeitpunkten zeigt sich jedoch, dass TNF α weder einen signifikant induzierenden noch einen hemmenden Einfluss auf die Akkumulation von HIF-1 α im Zellkern der Neuroblastomzellen hat.



3.6 Detektion des Transkriptionsfaktors NF κ B an Zellextrakten mittels Western-Blot

3.6.1 Nachweis der Wirkung inflammatorischer Zytokine und von NO auf den Transkriptionsfaktor NF κ B in den Kelly-Zellen

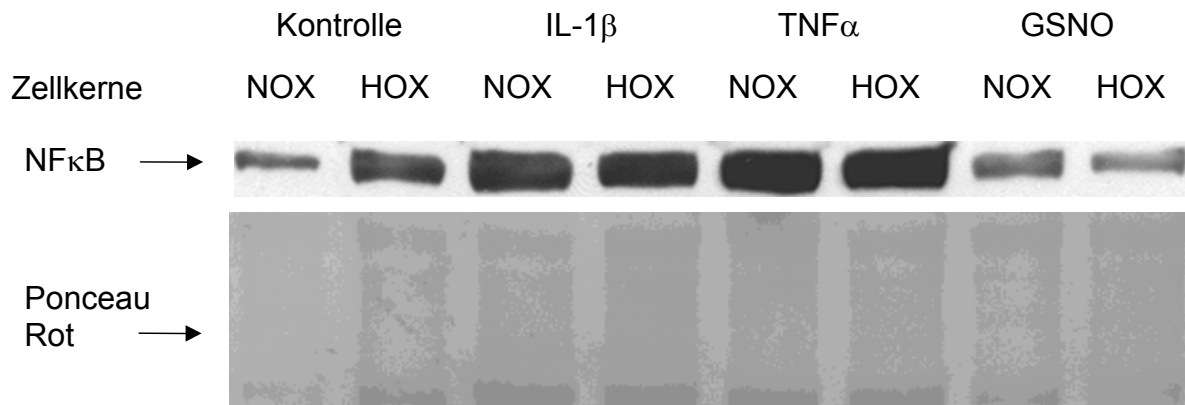
Der Transkriptionsfaktor NF κ B stellt ein wichtiges Signalmolekül in inflammatorischen Prozessen dar. Es stellt sich die Frage, ob der auch negativ regulierende Transkriptionsfaktor NF κ B in Neuroblastomzellen modulierend eingreift, wie es für Hepatomzellen beschrieben wurde (La Ferla et al., 2002).

Die Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurde für vier Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert (s. 3.5.1) und zusätzlich mit Interleukin-1 β , Tumor Nekrose Faktor α und S-Nitrosoglutathion behandelt. An Zellextrakten der Zellkernfraktion wurden Western-Blots für NF κ B durchgeführt.

Das Ergebnis der Western-Blot Analysen, die dreimal unter gleichen Versuchsbedingungen stattfanden, ist in Abb. 3.10 dargestellt.

In den Kernextrakten der Kelly-Zellen ist NF κ B unter normoxischen Kontrollbedingungen nachweisbar. Unter dem Einfluß der Hypoxie steigt der Anteil des Transkriptionsfaktors im Kern. IL-1 β besitzt bereits in Normoxie einen stimulierenden Einfluß auf den nachweisbaren Gehalt von NF κ B im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Eine weitere Verstärkung unter Hypoxie erfährt NF κ B jedoch nicht. Die stärkste Induktion von NF κ B in den NB-Zellen bewirkt TNF α , die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gleich stark visualisierbar ist. GSNO zeigt den schwächsten Einfluss auf NF κ B. Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle ist zwar auch durch GSNO NF κ B vermehrt im Kern nachweisbar. Es wird jedoch weder durch Standardbedingungen noch durch Absenkung des pO $_2$ NF κ B im gleichen Maße wie unter IL-1 β oder TNF α gebildet. Zusammenfassend wird deutlich, dass sowohl die Hypoxie als auch die inflammatorischen Zytokine,

dagegen weniger NO, eine positiv modulierende Wirkung auf den NF κ B Gehalt im Kern der Neuroblastomzellen haben.



bb. 3.10: Darstellung der Ponceau-Rot-Färbung (als Ladekontrolle) sowie Detektion von NF κ B durch Western-Blot Analysen in den Zellkernen der NB-ellinie Kelly. Unter Zugabe von IL-1 β , TNF α und GSNO wurden die Versuche 1er Std. je in Normoxie und 3% Hypoxie durchgeführt.

3.6.2 Nachweis der Wirkung von TNF α auf den Transkriptionsfaktor NF κ B in den Kelly-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Kelly-Zellen reagierten bei unseren Western-Blot Analysen (s.3.5.2) unter TNF α Einfluss mit der stärksten Induktion auf den Transkriptionsfaktor NF κ B. Daher wurden nun Beobachtungen notwendig, die eine Aussage über das Verhalten von NF κ B nach TNF α Behandlung über verschiedene hypoxische Inkubationszeiträume erlauben. Dazu wurden die Neuroblastomzellen für zwei, vier, acht, sechzehn und vierundzwanzig Stunden bei 3% O₂ inkubiert und mit TNF α behandelt. An Zellextrakten der Zellkernfraktion wurden Western-Blots für NF κ B durchgeführt.

Eine Darstellung der Western-Blot Analysen, die zweimal unter gleichen Versuchsbedingungen stattfanden, dokumentiert Abb. 3.11.

Es ist ersichtlich, dass NF κ B im Vergleich zur negativen Kontrolle über den gesamten Zeitverlauf vermehrt in den Zellkernen der Kelly-Zellen zu detektieren ist, die mit TNF α inkubiert wurden. Besonders deutlich wird dies nach zwei und vier Stunden. Während NF κ B nach acht, sechzehn und vierundzwanzig Stunden zwar weniger stark nachweisbar ist, zeigt sich jedoch auch jetzt noch der positiv induzierende Einfluss von TNF α auf das Vorkommen von NF κ B im Zellkern der Neuroblastomzellen.

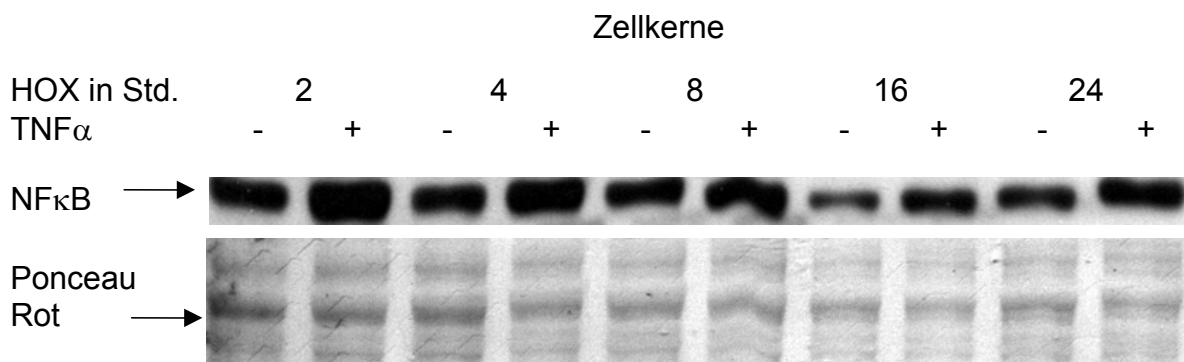


Abb. 3.11: Darstellung der Ponceau-Rot-Färbung (als Ladekontrolle) sowie Detektion von NF κ B durch Western-Blot Analysen in den Zellkernen der NB-Zelllinie Kelly. Die Versuche wurden jeweils ohne und mit Zugabe von TNF α 2, 4, 8, 16 und 24 Std. unter Hypoxie 3% durchgeführt.

3.7 Nachweis transkriptioneller Aktivität durch transiente Transfektion des pH3SVL-Plasmids in Kelly-Zellen

3.7.1 Nachweis der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 α in Neuroblastom-Zellen der Linie Kelly

Das pH3SVL-Plasmid beinhaltet das Luciferasereporterogen unter der Kontrolle des SV 40 Promotors und dreier Hypoxia Responsiver Elemente (HRE) aus dem 5' Enhancer des Transferrings (Tf). HREs des Transferrings bestehen aus jeweils zwei HIF-Bindungsstellen. Unter der Kontrolle der HIF-Bindungsstellen steht das Reporterogen Luciferase, dessen Aktivität in Zellextrakten nachgewiesen werden kann. Aus der Aktivität des Luciferasereportergens kann man Rückschlüsse auf die Wirkung der akkumulierten HIF-1-Komplexe bezüglich ihrer transkriptionellen Aktivität ziehen. Mittels Elektroporation wurde das pH3SVL-Plasmid in die Neuroblastomzellen transient transfiziert (s.2.11).

Für die Experimente wurden die Zellen nach Transfektion auf Kulturplatten mit 24 Vertiefungen über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert; danach wie in 2.1 erwähnt gewaschen, lysiert und eingefroren.

In Abb. 3.12 wird deutlich, dass unter Hypoxie nicht nur die Akkumulation von HIF-1 α in den Kelly-Zellen deutlich nachweisbar ist (s. 3.5.1), sondern dass auch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 hypoxisch induzierbar ist. Unter niedrigem Sauerstoffgehalt (3% O₂) steigt die Aktivität signifikant von $5,0 \pm 1,3$ auf $321,5 \pm 41,4$ RLU (Relative Light Units) um das 64fache (n = 4) an.

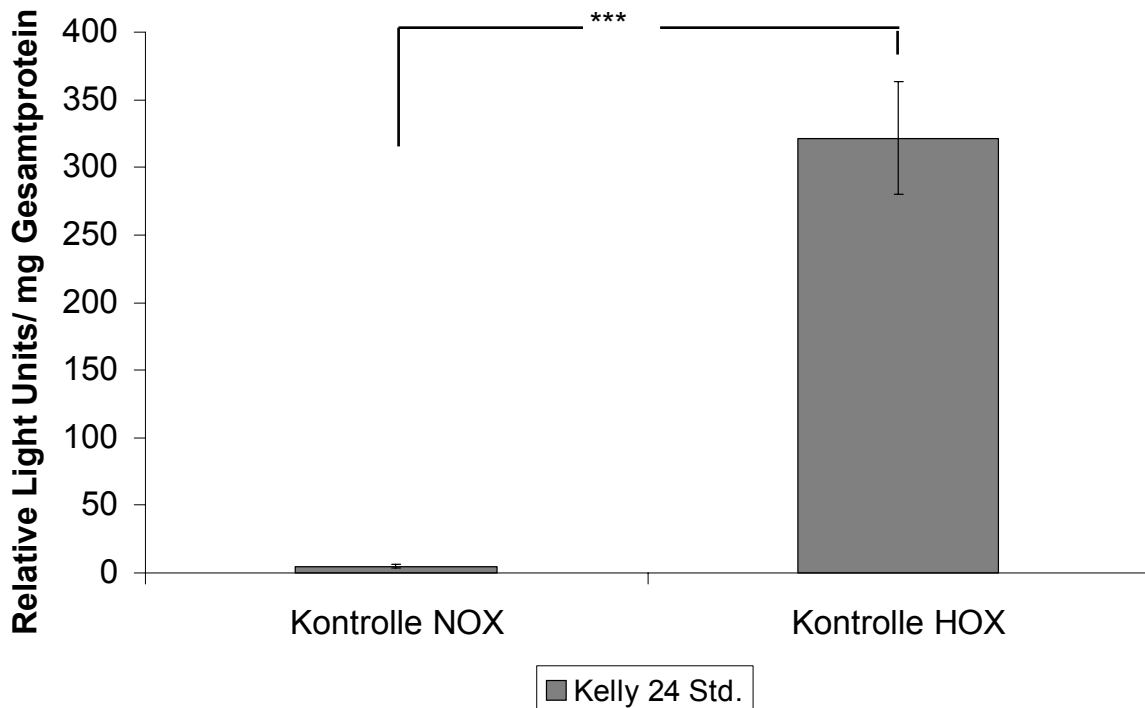


Abb. 3.12: Einfluß der Hypoxie auf die Luciferasegenexpression angegeben in Relative Light Units normalisiert auf mg Gesamtprotein. Die mit dem pH3SVL Plasmid transient transfizierten Kelly-Zellen wurden 24 Std. unter Normoxie oder Hypoxie (3% O₂) inkubiert (Mittelwert \pm Standardabweichung, *** = P < 0,001, n = 3).

3.7.2 Nachweis der Wirkung inflammatorischer Zytokine und von NO unter Normoxie und Hypoxie auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α in den Neuroblastom-Zellen der Linie Kelly

Nach der Bestimmung hypoxisch-induzierter transkriptioneller Aktivität von HIF-1 α in den Kernen der Neuroblastomzelllinie folgten Untersuchungen zur Wirkung von Zytokinen und NO unter Normoxie und Hypoxie. Mittels Elektroporation wurde das pH3SVL-Plasmid in die Neuroblastomzellen transient transfiziert (s.2.11).

Für die Experimente wurden die Zellen nach Transfektion auf Kulturplatten mit 24 Vertiefungen über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert.

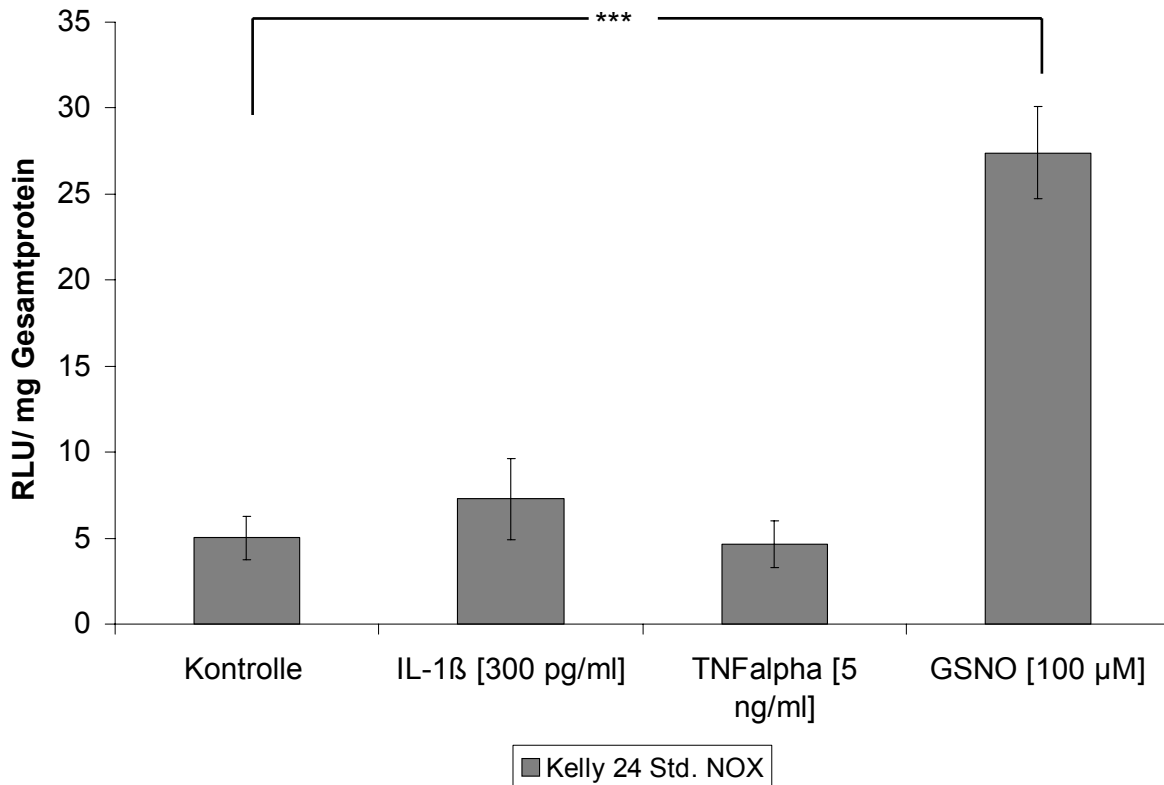


Abb. 3.13: Effekte der Zytokine auf die Luciferasegenexpression RLU = Relative Light Units normalisiert auf mg Gesamtprotein. Die mit dem pH3SVL Plasmid transient transfizierten Kelly-Zellen wurden 24 Std. normoxisch unter Zytokin-einfluss inkubiert (Mittelwert \pm Standardabweichung, *** = $P < 0,001$, $n = 3$).

Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert und zusätzlich mit IL-1 β , TNF α und S-Nitrosoglutathion behandelt. Danach wurden sie gewaschen, lysiert und eingefroren wie in 3.7.1 erwähnt.

Es ist ersichtlich, dass unter normoxischen Bedingungen nur der NO-Donor GSNO die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in den Kelly-Zellen von $5,0 \pm 1,3$ auf $27,4 \pm 2,7$ RLUs um das 5,5fache steigert (s. Abb.: 3.13, $n=4$). IL-1 β und TNF α bleiben nach 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ohne signifikante Auswirkung auf HIF-1 in den Neuroblastomzellen.

Abb. 3.14 (n=4) verdeutlicht, dass unter Hypoxie IL-1 β die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 um 53,8% stimuliert, während TNF α diese um 54,4% senkt. GSNO zeigt unter Hypoxie keinen signifikanten Einfluß auf HIF-1 in den Neuroblastom-Zellen.

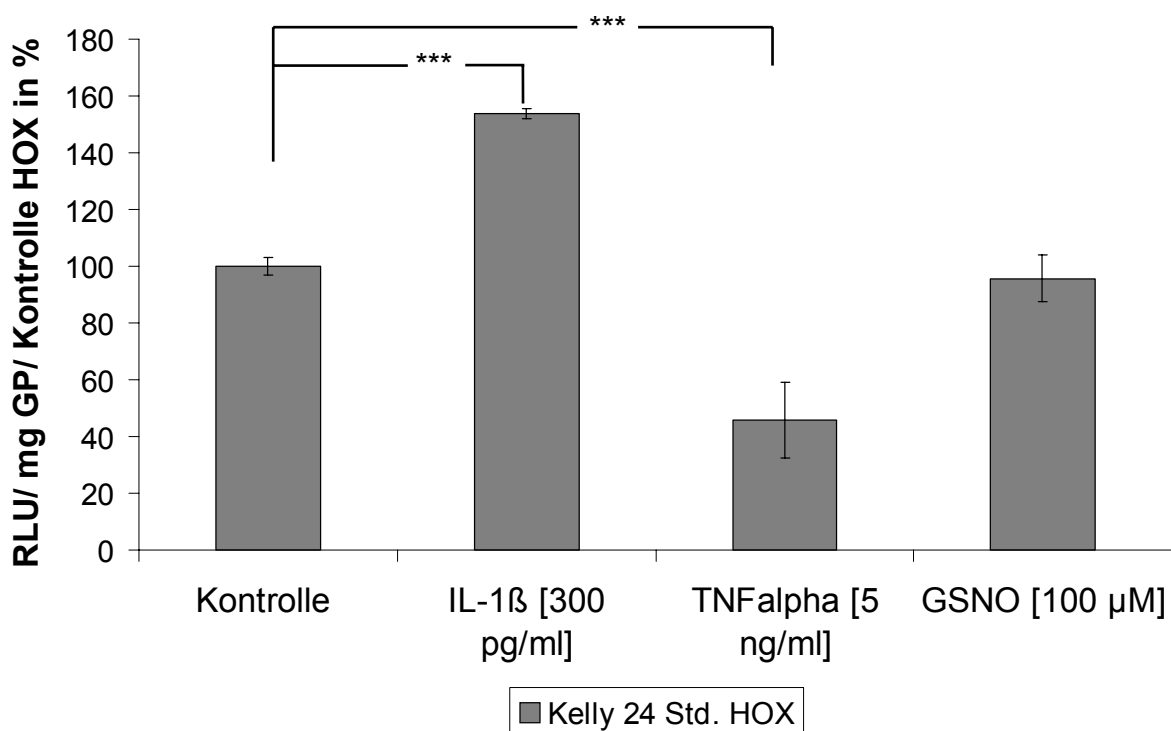


Abb. 3.14: Effekte der Zytokine auf die Luciferasegenexpression RLU = Relative Light Units normalisiert auf mg Gesamtprotein bezogen auf die unbehandelte Kontrolle in %. Die mit dem pH3SVL Plasmid transient transfizierten Kelly-Zellen wurden 24 Std. hypoxisch (3% O₂) unter Zytokineinfluss inkubiert (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3, *** = P < 0,001).

4. Diskussion

4.1 Hypoxie-induzierte Expression biologisch aktiven Erythropoietins in der humanen Neuroblastomzelllinie Kelly

Die Bildung des Hormons Erythropoietin ist komplex reguliert. Die Expression des Erythropoietin-Gens wird durch Sauerstoffmangel angeregt, wodurch das Gen als Paradigma der Hypoxie-induzierten Expression etabliert werden konnte. Während der Fetalzeit wird Erythropoietin fast ausschließlich in der Leber exprimiert, wohingegen beim Erwachsenen die Nieren der Hauptbildungsort sind. Um den Geburtszeitpunkt kommt es zu einem Wechsel der Organlokalisierung der Erythropoietin-Expression, der bisher unvollständig verstanden ist (Dame et al., 1998). Darüber hinaus ist in den letzten Jahren bekannt geworden, dass auch im Gehirn Erythropoietin gebildet wird, wo es unter Umständen neuroprotektiv wirkt. Zum Verständnis der Bildung von Erythropoietin gilt es daher, sowohl die Sauerstoff-abhängige als auch die Gewebe-spezifische Expression aufzuklären. Bisher wurden Untersuchungen an zwei gut charakterisierten Hepatomzellen der Linien HepG2 und Hep3B durchgeführt, die in der Lage sind, in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck Erythropoietin zu bilden (Goldberg et al., 1987). Wenn diese Zellen hypoxischen Inkubationsbedingungen ausgesetzt werden, so steigen die Expression des Erythropoietin-Gens und die Sekretion des biologischen aktiven Proteins in den Kulturüberstand. Die Etablierung einer Nierenzelllinie, deren Zellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck Erythropoietin produzieren, ist bisher nicht geglückt. Dagegen konnten kürzlich zwei Neuroblastomzelllinien identifiziert werden, die ebenfalls in der Lage sind, Sauerstoff-abhängig Erythropoietin zu bilden (Stolze et al., 2002). Diese beiden Neuroblastomzelllinien, Kelly und SH-SY5Y, weisen einen überwiegend neuronalen Phänotyp auf. Beide Zelllinien zeigten neben der Hypoxie-induzierten Expression des Erythropoietin-Gens ebenfalls die Sekretion von Erythropoietin-Protein in den Zellkulturüberstand.

Damit bilden diese beiden Zelllinien zusätzlich zu den bisher verwendeten Hepatomzellen ein in-vitro-Modell zur Untersuchung der Sauerstoff-abhängigen und Gewebe-spezifischen Expression des Erythropoietin-Gens.

Am Anfang der hier vorliegenden Studie stand die exakte Charakterisierung der hypoxischen Induzierbarkeit der Erythropoietin-Bildung in der Neuroblastomzelllinie Kelly. Vor allem gelang der Nachweis, dass das bisher nur immunologisch detektierte Erythropoietin-Protein auch biologisch aktiv ist. Dieser Befund ergänzt den Nachweis des Erythropoietin-Proteins mithilfe eines ELISAs sowie die Darstellung der Erythropoietin-mRNS mittels der RT-PCR. Die hier vorliegenden Daten, auch im Vergleich zur Hepatomzelllinie HepG2, stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen zur Identifizierung der Neuroblastomzelllinien (Stolze et al., 2002). Die Untersuchung hier bestätigt, dass die Erythropoietin-Expression und die Sekretion des Erythropoietin-Proteins nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation deutlich gegenüber normoxischen Kontrollzellen gesteigert und bezüglich der Sekretionsrate an biologisch aktiven Proteinen mit HepG2 vergleichbar sind. Neu und von Bedeutung ist hier der Befund, dass das in den Kulturüberstand sezernierte Erythropoietin-Protein auch biologisch aktiv ist. Mithilfe einer Maus-Leukämiezelllinie (Ba/F3), die stabil mit dem Erythropoietin-Rezeptor des Menschen transfiziert ist und in Abhängigkeit von der Erythropoietin-Konzentration im Zellkulturmedium proliferiert, konnte mit konditionierten Medien aus normoxisch, hypoxisch und anoxisch inkubierten Kelly-Zellen eindeutig die biologische Aktivität des von den Neuroblastomzellen sezernierten Erythropoietins festgestellt werden. Dieser Befund unterstreicht die Verwendbarkeit der Neuroblastomzellen als Modell für die neuronale Erythropoietin-Expression.

Zellen des Zentralnervensystems bilden Erythropoietin, welches dort auch als Wachstumsfaktor (Wollman et al., 1996), vor allem aber neuroprotektiv wirken soll. Diese Wirkung kann einerseits durch im ZNS gebildetes Erythropoietin bewirkt werden (Sadamoto et al., 1998; Sakanaka et al., 1998; Dame et al., 2000) oder

durch extern appliziertes rekombinantes Erythropoietin erreicht werden, das nach neuesten Ergebnissen die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Brines et al., 2000; Lewczuk et al., 2000; Celik et al., 2002). Zudem wurde kürzlich berichtet, dass Hypoxie in neuronalen Zellkulturen die Expression des Erythropoietin-Rezeptors sowie die Sensitivität für Erythropoietin erhöhen soll (Chin et al., 2000; Cerami, 2001). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von Neuroblastomzellen als in vitro-Modell für Untersuchungen der zugrunde liegenden Mechanismen der Erythropoietin-Bildung und -Wirkung.

4.2 Modulation der hypoxischen Erythropoietin-Synthese in Kelly-Zellen durch Interleukin-1 β , Tumor Nekrose Faktor α und S-Nitrosoglutathion

Bei chronischen Entzündungen oder Tumorerkrankungen wird häufig eine Anämie beobachtet, deren Ursache zum Teil in einem Mangel an Erythropoietin liegt (Jelkmann, 2003). Für Untersuchungen der zugrunde liegenden Mechanismen haben sich HepG2-Zellen als etabliertes Modell zur hypoxischen Erythropoietin-Regulation als geeignet erwiesen. In diesen Zellen wird unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie dem Interleukin 1 β (IL-1 β) oder Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) sowie dem Entzündungsmediator NO eine reduzierte Bildung von Erythropoietin beobachtet. Für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α konnte gezeigt werden, dass ihre Effekte auf einer Hemmung der Expression des Erythropoietin-Gens beruhen (Jelkmann et al., 1992; Faquin et al., 1992), während für die Wirkung von NO ein biphasischer Verlauf gezeigt wurde (Genius und Fandrey, 2000). Während die Exposition der Zellen von NO in den ersten vier Stunden zu einer erhöhten Erythropoietin-Genexpression führte, war die Bildung nach 24 Stunden signifikant vermindert.

Durch Untersuchungen von Nagai und Mitarbeitern (2001) wurde ein Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von Erythropoietin und den

Erythropoietin-Rezeptor in Kulturen menschlicher Neuronen, Astrozyten und Mikroglia verdeutlicht. Die Produktion von Erythropoietin-mRNS und Erythropoietin-Protein konnte nur in menschlichen Astrozyten nachgewiesen werden und wurde durch die Gabe von IL-1 β , TNF α und Interleukin 6 vermindert (Nagai et al., 2001).

Die Ergebnisse unserer Erythropoietin-Messungen mittels ELISA und der Erythropoietin-mRNS mithilfe der real-time PCR erhärten die These, dass den Mediatoren TNF α , NO und IL-1 β auch in der Neuroblastomzelllinie Kelly unter Hypoxie eine negativ regulierende Funktion zukommt. In den Kelly-Zellen wie auch den HepG2 ist diese Inhibition unter TNF α nach 24 Stunden auf Protein- und mRNS-Ebene signifikant ausgeprägt, aber bereits nach sechs und sechzehn Stunden zu erkennen. Der NO-Donor GSNO zeigt nach 24 Stunden Inkubation nur eine geringfügige Verminderung von Erythropoietin-Protein und Erythropoietin-mRNS, während nach sechs und sechzehn Stunden keine Modulation der Erythropoietin-mRNS gefunden werden kann. Hier lässt sich wohl eine Parallele zu den von Genius und Fandrey (2000) erhobenen Daten ziehen. In dieser Untersuchung war die Bildung von Erythropoietin während der ersten vier Stunden gesteigert, während sich nach 24 Stunden eine verminderte Expression des Erythropoietin-Gens zeigte. Allerdings wurden in dieser Untersuchung HepG2- bzw. Hep3B-Hepatomzellen verwendet, so dass die Möglichkeit besteht, dass der unterschiedliche Zeitgang durch den Phänotyp anderen zellulären Ursprungs erklärt werden kann. Ebenfalls interessant ist die Tatsache, dass IL-1 β nach 24 Stunden in den NB-Zellen zwar wie in den HepG2 eine Reduktion der Erythropoietin-mRNS aufweist, die jedoch nicht mit vermindertem Erythropoietin-Proteinspiegel im Zellkulturüberstand einhergeht. Dies steht im Gegensatz zu Daten aus Untersuchungen an HepG2-Zellen und wirft die Frage auf, ob auch bezüglich der Zytokine TNF α und IL-1 β unterschiedliche, Gewebe-spezifische Mechanismen der Erythropoietin-Genregulation angestoßen werden.

4.3 Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Erythropoietin-Gen Aktivierung

4.3.1 HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktorkomplex HIF-1 gilt als zentraler Regulator der Sauerstoffhomöostase (Semenza, 2001). HIF-1 reguliert mehr als 50 Hypoxie-induzierbare Gene und koordiniert in Zellen und im Gewebe die adäquate Antwort auf Sauerstoffmangel (Wenger, 2002). Akkumulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes HIF-1 führt zu dessen vermehrter Bindung an sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HRE) im Promotor oder Enhancerbereich der DNS Hypoxie-induzierbarer Gene. So bindet HIF-1 an das HRE im 3'-Enhancer des Erythropoietin-Gens (Fandrey, 2004) und erhöht durch vermehrte Transkription des Erythropoietin-Gens den Gehalt an Erythropoietin-mRNS in der Zelle (Semenza, 1994). Die Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF-1 erfolgt ausschließlich über die O₂-labile α -Untereinheit, während die β -Untereinheit konstitutiv in Zellen exprimiert wird. Während unter gut oxygenierten Bedingungen die α -Untereinheit weder im Zytoplasma noch im Kern der Zellen nachzuweisen ist, wird unter Hypoxie die α -Untereinheit stabilisiert, so dass sie akkumulieren kann. Die 120 kDa große α -Untereinheit wird in den Kern transloziert, wo sie mit der β -Untereinheit (91-94 kDa), die konstitutiv im Zellkern vorhanden ist, dimerisiert und an das HRE binden kann (Wang et al., 1995). HIF-1 β ist identisch mit dem AhR Nuclear Translocator (ARNT1), der mit dem Dioxin Rezeptor/Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) dimerisiert (Hoffman et al., 1991). Zusätzlich wird in Neuronen und Nierenzellen das zu ARNT1 homologe ARNT2 exprimiert (Drutel et al., 1996). Neben der Regulation des HIF-1 α -Gehaltes durch den Sauerstoffpartialdruck wird zudem die Aktivität in bezug auf die DNS-Bindung und die Aktivierung der Genexpression durch den pO₂ reguliert. Für diese Regulation ist das C-terminale Ende des HIF-1 α -Proteins von großer Bedeutung. An dieses C-terminale Ende der HIF-1 α -Untereinheit bindet spezifisch der

Transkriptionskoaktivator CBP/p300, der als ein Gerüst zur weiteren Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren dient (Huang et al., 1997). Hemmung der Bindung dieser Proteine an das C-terminale Ende von HIF-1 α verhindert trotz Hypoxie die Expression des Erythropoietin-Gens. Zudem konnte in HepG2- und Hep3B-Zellen gezeigt werden, dass an die C-terminale aktivierende Domäne über die Bindung von p300 eine Verbindung zu dem Transkriptionsfaktor HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4) hergestellt wird, der konstitutiv in Leber und Niere gefunden wird. Dieser Transkriptionsfaktor kooperiert mit dem HIF-1-Komplex in Bezug auf die Erythropoietin-Expression (Fandrey, 2004). Für HNF4 wurde eine Rolle in der Gewebe-spezifischen Expression des Erythropoietin-Gens postuliert (Galson et al., 1995). Deshalb ist es von besonderem Interesse, dass Stolze et al. kürzlich zeigen konnten, dass die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly kein HNF4 exprimieren (Stolze et al., 2002), jedoch in der Lage sind, Sauerstoff-abhängig Erythropoietin zu bilden.

Die Sauerstoff-abhängige Akkumulation von HIF-1 α konnte in weiten Teilen in den letzten Jahren aufgeklärt werden. HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich über die Proteasomen abgebaut, da Prolinhydroxylasen und deren Aktivität vom Sauerstoffpartialdruck abhängig sind. Zwei Prolinreste im HIF-1 α werden hydroxyliert (Ivan et al., 2001), so dass hydroxyliertes HIF-1 α vom Tumorsuppressorprotein von-Hippel-Lindau (VHL) Protein erkannt wird, ubiquitiniliert und anschließend über Proteasomen abgebaut werden kann (Salceda und Caro, 1997; Maxwell et al., 1999). Zudem wird die Aktivität des C-terminalen Endes von HIF-1 α durch eine Hydroxylierung des Asparagins 803 reguliert, das bei hohem pO₂ in hydroxyliertem Zustand nicht in der Lage ist, den Koaktivator p300 zu binden. Unter Sauerstoffmangel unterbleibt die Hydroxylierung der Prolinreste und somit der Abbau, so dass HIF-1 α akkumulieren kann. Gleichzeitig wird durch Hemmung der Asparagylhydroxylase die HIF-1 α -Untereinheit aktiviert, so dass Koaktivatoren wie das p300 an den C-Terminus binden können.

Insulin und Insulin-like Growth Factor (IGF; Zelzer et al., 1998, Stiehl et al., 2002) sowie Zytokine wie IL-1 β und TNF α (Hellwig-Bürgel et al., 1999) induzieren ebenfalls die Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit. Für NO sind divergierende Effekte beschrieben worden, die sich wahrscheinlich durch die Tatsache erklären lassen, dass die initiale Behandlung mit NO die Expression von HIF-1 α - und Erythropoietin-Protein induziert, während längere Inkubation mit NO diese reduziert (Genius und Fandrey, 2000).

Da bisher nur Ergebnisse von Hepatomzellen vorliegen, besteht ein außerordentliches Interesse, etwas über die Stabilisation von HIF-1 α in den Neuroblastomzellen unter Zytokin- und NO-Einfluss zu erfahren. HIF-1 α weist nach vierstündiger Inkubation der Zellen mit IL-1 β und GSNO eine verstärkte Akkumulation im Kern auf, eine Parallele zu HepG2-Versuchen. Die Zugabe von TNF α ändert nichts am Akkumulationsverhalten von HIF-1 α im Kern im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle. Dies ist ein großer Unterschied zu den Hepatomzellen HepG2, in denen sowohl unter IL-1 β als auch TNF α eine vermehrte Akkumulation von HIF-1 α detektiert werden kann (Hellwig-Bürgel et al., 1999). Um nun herauszufinden, ob HIF-1 α in den Kelly-Zellen gerade unter TNF α -Inkubation auch über den Zeitverlauf nicht vermehrt akkumuliert, sind Western-Blots nach verschiedenen Zeitpunkten angefertigt worden. Zwar ließ sich eine durch Hypoxie-induzierte verstärkte Akkumulation nachweisen, die ihr Maximum im Bereich von acht Stunden findet, jedoch zeigt sich zu allen Zeitpunkten, dass TNF α weder einen induzierenden noch einen hemmenden Einfluss auf die Akkumulation von HIF-1 α im Zellkern der Neuroblastomzellen hat. In den Kernextrakten der Kelly-Zellen ist HIF-1 β /ARNT1 unter Einfluss der Versuchsreagenzien konstitutiv nachweisbar.

Die Stabilität von HIF-1 α allein reicht nicht zu seiner Aktivierung. Die Aktivierungskaskade umfasst die bereits erwähnte nukleäre Translokation, Heterodimerisation mit HIF-1 β /ARNT1, Bindung an die DNS, Rekrutierung von

allgemeinen und gewebspezifischen Transkriptionskofaktoren, z.B. CBP/p300 oder HNF4, und Zielgenaktivierung (Fandrey, 2004). Auch der posttranslationalen Proteinphosphorylierung scheint bei der Aktivierung von HIF-1 α eine wichtige Rolle zuzukommen. Dazu existieren zwei wichtige Phosphorylierungspfade: Zum einen der Weg über die p42/p44 (ERK2/ERK1) Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), die HIF-1 α aktivieren (Richard et al., 1999); zum anderen, unter Beteiligung des Rezeptors Tyrosinkinase, die Phosphatidylinositol-3-kinase, die über weitere Phosphorylierungsschritte AKT (Protein Kinase B) aktiviert, was schließlich zur Aktivierung von HIF-1 α führt und durch das Tumor Suppressor Genprodukt PTEN negativ kontrolliert wird (Zhong et al., 2000 Zundel et al., 2000). Es stellt sich die Frage, ob auch das in den Neuroblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen im Western-Blot detektierte stabilisierte HIF-1 transkriptionelle Aktivität aufweist. Die Tatsache, dass nicht nur 24-stündige hypoxische Inkubation der Kontrolle sondern auch normoxische Inkubation unter NO-Behandlung eine vermehrte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 aufweist, ist möglicherweise von besonderer Bedeutung. Vor allem, da NO unter Hypoxie im gleichen Zeitrahmen keinen signifikanten Einfluss im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle zu haben scheint. Im Gegensatz hierzu wiesen Untersuchungen mit HEK293-Zellen, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie, die unter 1% Hypoxie vier Stunden mit NO inkubiert wurden, auf eine verminderte HIF-1 α -Stabilisation und -Aktivierung hin. Darin bewirkt NO als Hemmstoff der intrazellulären Atmungskette die verminderte Wahrnehmung der Hypoxie durch Prolinhydroxylasen, die daraufhin wiederum einen vermehrten Abbau von HIF-1 α induzieren (Hagen et al., 2003). IL-1 β und TNF α bleiben nach 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ohne signifikante Auswirkung auf HIF-1 in den Neuroblastomzellen. Unter Hypoxie stimuliert IL-1 β die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 signifikant, während TNF α diese signifikant vermindert. Interleukin 1 β und der NO-Donor GSNO zeigen in der hier vorliegenden Arbeit nur geringe Inhibition der EPO-Genexpression, während HIF-1 α unter Hypoxie vermehrt

akkumuliert. Die Aktivität von HIF-1 wird bereits unter normoxischen Bedingungen von NO induziert, bleibt unter Hypoxie annähernd gleich; nur IL-1 β vermag die bereits hypoxisch-induzierte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 noch zu steigern. TNF α , der in den Kelly-Zellen stärkste Inhibition von Erythropoietin-mRNS und Erythropoietin-Protein induziert, zeigt keinerlei Beteiligung an HIF-1 α -Akkumulation im Gegensatz zu HepG2-Zellen, sondern vermindert sogar die Aktivität von HIF-1.

Untersuchungen belegen, dass sowohl bei generalisierter (Wiener et al., 1996) als auch bei fokaler (Bergeron et al., 1999) Hypoxie des Hirngewebes vermehrt HIF-1 α -mRNS und -Protein zu detektieren waren. Die Beteiligung von HIF-1 an der Zellantwort auf das ischämische zentralnervöse Geschehen kann jedoch durchaus unterschiedliche Auswirkungen haben (Kietzmann et al., 2001): Einerseits wird HIF-1 als Signalfaktor für gravierende hypoxische Zellschädigung angesehen, der selbst unter Beteiligung des Tumor Suppressors p53 neuronalen Zelltod hervorrufen kann (Haltermann et al., 1999). Andererseits schaffen moderate Phasen der Hypoxie sowie Applikation von CoCl₂ oder Desferrioxamin einen sogenannten präkonditionierenden, protektiven Effekt, der vor weiterer hypoxischer Schädigung schützt (Bergeron et al., 2000). Ruscher und Mitarbeiter (2002) postulieren nach Befunden in-vitro, dass über die Aktivierung von HIF in Astrozyten die Expression und Freisetzung von Erythropoietin nach ischämischer Präkonditionierung einen protektiven Effekt auf Neurone ausübt. Hierbei spielt intraneuronal die Signalkaskade des Erythropoietin-Rezeptors, die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) via AKT-modulierter Phosphorylierung, eine Rolle. Diese Signalkaskade inaktiviert das proapoptotisch wirkende BAD, ein Mitglied der Bcl Familie. Der HIF-1-induzierten Erythropoietin-Expression kommt auch über den PI3K-Weg eine wichtige neuroprotektive Funktion zu (Ruscher et al., 2002). Diese Signalkaskade ermöglicht unter Einwirkung von IL-1 β (Stiehl et al., 2001) und NO (Sandau et al., 2000) die Induktion von HIF-1 α unter Normoxie in Hepatomzellen, so dass auch in den Kelly-Zellen diese Signalkaskade zur Diskussion steht.

4.3.2 NF κ B

Nuclear Factor kappa B (NF κ B) ist ein wichtiges Signalmolekül bei inflammatorischen Prozessen und aktiviert die Induktion einer Vielzahl von Genen (Siebenlist et al., 1994). Digicaylioglu und Lipton (2001) schrieben NF κ B sogar eine über Erythropoietin-vermittelte neuroprotektive Rolle zu. Die Behandlung von Astrozyten mit den inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α führt zur Aktivierung von NF κ B (Moynagh et al., 1993; Sparacio et al., 1992). Dieser Transkriptionsfaktor ist aus homo- oder heterodimeren Komplexen zusammengesetzt, die Mitglieder der Rel/NF κ B Familie sind. Diesen Proteinen ist eine homologe Domäne gemeinsam, die für die Dimerisation, die nukleäre Translokation und die Bindung an die DNS notwendig ist (Baldwin, 1996). Das p50/p65 Heterodimer ist der am besten charakterisierte NF κ B-Komplex. Er liegt im Zytosol gebunden an den Inhibitor I κ B in der inaktiven Form vor (Gosh und Baltimore, 1990). Bei Aktivierung der Zellen phosphoryliert I κ B Kinase (IKK) I κ B und initiiert dadurch die Ubiquitin kontrollierte Proteolyse (Ben-Neriah, 2002). In Abwesenheit von I κ B transloziert das aktive NF κ B in den Zellkern (Bäuerle, 1991). Durch Untersuchungen von Beg und Baldwin (1993) ließen sich verschiedene Mitglieder der I κ B-Familie nachweisen, von denen I κ B α (37 kDa) und I κ B β (46 kDa) die wichtigsten sind. Nach Aktivierung des I κ B α -Gens durch NF κ B kann I κ B α mit NF κ B den inhibitorischen Komplex im Zytoplasma bilden. Auch kann I κ B α selbst in den Zellkern translozieren, an NF κ B binden und NF κ B zurück ins Zytoplasma transportieren. Auf diese Weise wird ebenfalls die Aktivität von NF κ B reduziert (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). I κ B β hingegen bindet im Zytoplasma an NF κ B und transloziert als Komplex in den Zellkern, der dort an die DNS binden kann (Tran et al., 1997).

In den Untersuchungen von La Ferla und Mitarbeitern (2002) zeigen die HepG2-Zellen unter dem Einfluss von IL-1 β und TNF α unter Normoxie (20%) und

Hypoxie (3%) eine vermehrte Bindung von NF κ B an die DNS. Dieses Bindungsverhalten erreicht sein Maximum nach einer halben bis zu einer Stunde, während es nach zwei bis vier Stunden wieder abnimmt. Hypoxie allein induziert keine Bindung des p50/p65-Heterodimers an die DNS. Ergänzende Versuche mit stabil transfizierten Zellen, die mit einer dominant negativen Form von I κ B α , pCMV-I κ B α -M, transfiziert waren, zeigten im Vergleich zu den nicht-transfizierten HepG2 eine deutliche Reduktion der NF κ B-Bindung. Die proinflammatorischen Zytokine lassen sowohl in den unbehandelten als auch in den HepG2-Zellen, die mit dem Vektor pCMV-I κ B α transfiziert worden sind, eine Verminderung der Erythropoietin-mRNS-Expression erkennen, während die mit der pCMV-I κ B α -M-Variante transfizierten Zellen einen höheren Erythropoietin-mRNS-Gehalt aufweisen. Experimente mit Antisense-Oligo-nukleotiden gegen NF κ B-wt blockieren die NF κ B-Bindung und so die inflammatorisch-induzierte Erythropoietin-Reduktion, während die NF κ B-mut-Form die Inhibition der Erythropoietin-Produktion nicht verhindert. Diese Ergebnisse bestätigen die Beteiligung von NF κ B an der Inhibition der Erythropoietin-Genexpression unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine in HepG2-Zellen.

Im Vergleich zu den Studien über die in dieser Arbeit untersuchten Kelly-Zellen werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede deutlich: Bereits unter Hypoxie steigt der Anteil von NF κ B im Kern der Neuroblastomzellen. Durch Inkubation mit IL-1 β und TNF α wird unter norm- und hypoxischen Bedingungen ein erhöhter Gehalt von NF κ B im Zellkern durch Western-Blot-Analyse nachweisbar, der sein Maximum jedoch unter Hypoxie und TNF α -Gabe erreicht. Auch der Zeitverlauf mit TNF α veranschaulicht den induzierenden Einfluss auf NF κ B noch bis nach achtstündiger Stimulation. GSNO zeigt nur einen gering stimulierenden Einfluss auf NF κ B im Zellkern der Kelly-Zellen. Ob diese Beobachtungen sich auch auf Ebene der transkriptionellen Aktivität im Bereich der 5' Region und des Erythropoietin-Promotors fortsetzt, die Bindungsstellen für NF κ B beinhalten,

müßte durch entsprechende Transfektionsexperimente geklärt werden. Da IL-1 β zwar ebenfalls eine NF κ B-Aktivierung zu induzieren scheint, jedoch die Erythropoietin-Genexpression nicht so signifikant reduziert wie in den HepG2-Zellen und unter TNF α -Gabe, sollten weitere Wege der Signaltransduktion im Vergleich zu TNF α , z.B. über Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren untersucht werden. GATA-2, ein inhibitorisch regulierender Faktor, wird nur unter Zytokineinfluss in den HepG2-Zellen stimuliert und scheint nach Transfektionen der HepG2-Zellen mit Wildtyp und mutiertem GATA-2-Vektor (La Ferla et al., 2002) eine wichtige Rolle bei der Erythropoietin-Genexpression zu spielen. Zusätzlich zu den bisher verwendeten Hepatomzellen bildet daher die Neuroblastomzelllinie Kelly ein neues und bedeutsames in-vitro-Modell zur Untersuchung und Entschlüsselung weiterer Signalkaskaden der Sauerstoff-abhängigen und Gewebe-spezifischen Erythropoietin-Genexpression.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung von Tumor Nekrose Faktor α ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin- 1β ($\text{IL-1}\beta$) und S-Nitrosoglutathion (GSNO) für die Hypoxie-induzierte Erythropoietin-Bildung in der humanen Neuroblastom-zelllinie Kelly durchgeführt. Erythropoietin (EPO) wurde mittels Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) und als biologisch aktives Protein im Bioassay gemessen, die EPO-Botenribonukleinsäure (mRNS) wurde mittels qualitativer und quantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) ermittelt, die Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierbarer Faktor- 1α ($\text{HIF1-}\alpha$), AhR Nuclear Translocator1 (ARNT1) und Nuclear Factor κ B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) in Western-Blot-Analysen nachgewiesen und die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 im Luciferase-Reporterassay analysiert. Zytokine reduzieren auf mRNS-Ebene in beiden Zelllinien den Gehalt an EPO-mRNS. Die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ ist hier am deutlichsten. Die Messung des sezernierten EPOs zeigt, dass - im Vergleich zu den HepG2 -Zellen, bei denen die stärkste Hemmung unter $\text{IL-1}\beta$ erfolgt, - in den Kelly-Zellen die EPO-Bildung um 8% unter $\text{IL-1}\beta$, um 27% unter GSNO und um 35% unter $\text{TNF}\alpha$ sinkt. Western-Blot-Analysen weisen in Kelly-Zellen unter Einfluss von $\text{IL-1}\beta$ und GSNO im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle eine deutliche HIF-1 Akkumulation im Kern auf, während $\text{TNF}\alpha$ die Stabilisation von $\text{HIF-1}\alpha$ nicht verändert. $\text{TNF}\alpha$ reduziert die HIF-1 Aktivierung in Reporterassays, während $\text{IL-1}\beta$ diese steigert und GSNO ohne signifikanten Einfluss bleibt. In HepG2 ist bekannt, dass $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ zu einer verstärkten $\text{HIF-1}\alpha$ Akkumulation führen, jedoch eine Hemmung der EPO-Bildung erfolgt. Diese Verminderung wird zum Teil auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ zurückgeführt. In Kelly-Zellen bewirkt GSNO nur eine geringe Zunahme der Aktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ im Zellkern, während $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ $\text{NF}\kappa\text{B}$ stärker aktivieren. Da Zytokine die EPO-Genexpression in den Kelly-Zellen nicht so stark reduzieren wie in den HepG2, müssen weitere Wege der Signaltransduktion an der EPO-Expression in neuronalen Zellen beteiligt sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Acker, H. (1994):

Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism.

Respir. Physiol. 95, 1-10.

2. Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.-L., Dargemont, C. (1997):

Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm.

J. Cell Sci. 110, 369-378.

3. Bäuerle, P.A. (1991):

The inducible transcription activator NF κ B: regulation by distinct protein subunits.

Biochem. Biophys. Acta 1072, 63-80.

4. Baldwin, A.S. Jr. (1996):

The NF κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights.

Annu. Rev. Immunol. 14, 649-681.

5. Barosi, G., Marchetti, M., Liberato, N.L. (1998):

Cost-effectiveness of recombinant human erythropoietin in the prevention of chemotherapy-induced anemia.

Br. J. Cancer 78, 781-787.

6. Beg, A.A., Balwin, A.S. (1993):

The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/ NF κ B transcription factors.

Genes Dev. 7, 2064-2070.

7. Ben-Neriah, Y. (2002):

Regulatory functions of ubiquitination in the immune system.

Nature Immunol. 3, 20-26.

8. Bergeron, M., Gidday, J.M., Yu, A.Y., Semenza, G.L., Ferriero, D.M., Sharp, F.R. (2000):

Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain.

Ann. Neurol. 48, 285-296.

9. Bergeron, M., Yu, A.Y., Solway, K.E., Semenza, G.L., Sharp, F.R. (1999):

Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain.

Eur. J. Neurosci. 11, 4159-4170.

10. Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M. Cerami, A. (2000):

Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10526-10531.

11. Bunn, H.F., Poyton, R.O. (1996):

Oxygen sensing and molecular adaption to hypoxia.

Physiol. Rev. 76, 839-885.

12. Cazzola, M., Messinger, D., Battistel, V., Bron, D., Cimino, R., Enller, Z.L., Essers, U., Greil, R., Grossi, A., Jager, G., LeMevel, A., Najman, A., Silingardi, V., Spriano, M., van Hoof, A., Ehmer, B. (1995):
Recombinant human erythropoietin in the anemia associated with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma: dose finding and identification of predictors of response.
Blood 86, 4446-4453.
13. Celik, M., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Akhisaroglu, M., Konakc, S., Ulukus, C., Genc, S., Genc, K., Sagiroglu, E., Cerami, A., Brines, M. (2002):
Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2258-2263.
14. Cerami, A. (2001):
Beyond erythropoiesis: novel applications for recombinant human erythropoietin.
Semin. Hematol. 38 (Suppl. 7), 33-39.
15. Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T. (1998):
Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11715-11720.
16. Chin, K., Yu, X., Beleslin-Cokic, B., Liu, C., Shen, K., Mohrenweiser, H.W., Noguchi, C.T. (2000):
Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain.
Brain Res. Mol. Brain Res. 81, 29-42.

17. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987):

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem. 162, 156-159.

18. Dame, C., Bartmann, P., Wolber, E.-M., Fahnenstich, H., Hofmann, J., Fandrey, J. (2000):

Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system.

Dev. Brain Res. 125, 69-74.

19. Dame, C., Fahnenstich, H., Freitag, P., Hofmann, D., Thair, A.-N., Bartmann, P., Fandrey, J. (1998):

Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue.

Blood 92, 3218-3225.

20. Darlington, G.J., Wilson, D.R., Lawrence, L.B. (1986):

Monocyte-conditioned medium, interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro.

J. Cell. Biol. 103, 787-793.

21. Digicaylioglu, M., Lipton, S.A. (2001):

Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades.

Nature 412, 641-647.

22. Drutel, G., Kathmann, M., Héron, A., Schwartz, J.-C., Arrang, J.-M. (1996):
Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the
Ah receptor nuclear translocator (ARNT).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 225, 333-339.
23. Fandrey, J. (1995):
Hypoxia-inducible gene expression.
Respir. Physiol. 101, 1-10.
24. Fandrey, J. (2004):
Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene
expression.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286, R977-R988.
25. Fandrey, J., Bunn, H.F. (1993):
In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by
competitive polymerase chain reaction.
Blood 81, 617-623.
26. Fandrey, J., Frede, S., Jelkmann, W. (1994):
Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production.
Biochem. J. 303, 507-510.
27. Fandrey, J., Genius, J. (2000):
Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression.
Adv. Exp. Med. Biol. 475, 153-159.

28. Fandrey, J., Huwiler, A., Frede, S., Pfeilschifter, J., Jelkmann, W. (1994):
Distinct signaling pathways mediate phorbol-ester-induced and cytokine-induced inhibition of erythropoietin gene expression.
Eur. J. Biochem. 226, 335-340.
29. Faquin, W.C., Schneider, T.J., Goldberg, M.A. (1992):
Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production.
Blood 79, 1987-1994.
30. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira G., Semenza G.L. (1999):
Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2.
Cancer Res. 59, 3915-3918.
31. Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997):
The biology of vascular endothelial growth factor.
Endocr. Rev. 18, 4-25.
32. Galson, D.L., Tsuchiya, T., Tendler, D.S., Huang, L.E., Ren, Y., Ogara, T., Bunn, H.F. (1995):
The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/ COUP-TF1.
Mol. Cell. Biol. 15, 2135-2144.
33. Genius, J., Fandrey, J. (2000):
Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: Implications for the process of oxygen sensing.
Free Radic. Biol. Med. 29, 515-521.

34. Goldberg, M.A., Glass, G.A., Cunningham, J.M., Bunn, H.F. (1987):
The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7972-7976.
35. Gosh, S., Baltimore, D. (1990):
Activation in vitro of NF κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B.
Nature 344, 678-682.
36. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., Giaccia, A.J. (1996):
Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors.
Nature 379, 88-91.
37. Green, S.L., Giaccia, A.J. (1998):
Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy.
Cancer J. Sci. Am. 4, 218-223.
38. Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., Moncada, S. (2003):
Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: Effect on HIF1 α .
Science 302, 1975-1978.
39. Haltermann, M.W., Miller, C.C., Federoff, H.J. (1999):
Hypoxia-inducible factor-1 α mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53.
J. Neurosci. 15, 6818-6824.

40. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989):
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth and cell kill.
J. Immunol. Meth. 119, 203-210.
41. Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (1999):
Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.
Blood 94, 1561-1567.
42. Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., Hankinson, O. (1991):
Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor.
Science 252, 954-958.
43. Huang, L.E., Ho, V., Arany, Z., Krainc, D., Galson, D., Tendler, D., Livingston, D.M., Bunn, H.F. (1997):
Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen-sensing and assembly of interacting transcription factors.
Kidney Int. 51, 548-552.
44. Imagawa, S., Yamamoto, M., Ueda, M., Miura, Y. (1996):
Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide.
Int. J. Hematol. 64, 189-195.

45. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G. (2001):
HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.
Science 292, 464-468.
46. Jelkmann, W., (1992):
Erythropoietin: structure, control of production and function.
Physiol. Rev. 72, 449-489.
47. Jelkmann, W. (1998):
Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production.
J. Interferon Cytokine Res. 18, 555-559.
48. Jelkmann, W. (2003):
Erythropoietin.
J. Endocrinol. Invest. 26, 832-837.
49. Jelkmann, W., Pagel, H., Wolff, M., Fandrey, J. (1992):
Monokines inhibiting erythropoietin production in human hepatoma cultures and in isolated perfused rat kidneys.
Life Sci. 50, 301-308.
50. Kelleher, D.K., Mattheisen, U., Thews, O., Vaupel, P. (1996):
Blood flow, oxygenation and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats.
Cancer Res. 56, 4728-4734.

51. Kietzmann, T., Knabe, W., Schmidt-Kastner, R. (2001):
Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain:
involvement in neuroprotection and cell death.
Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 251, 170-178.
52. La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W., Hellwig-Bürgel, T. (2002):
Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription
factors GATA-2 and NF κ B.
FASEB J. 16, 1811-1813.
53. Lewczuk, P., Haselblatt, M., Kamrowski-Kruck, H., Heyer, A., Unzicker, C.,
Siren, A.L., Ehrenreich, H. (2000):
Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effects of erythropoietin.
Neuroreport 11, 3485-3488.
54. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951):
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
55. Maxwell, P.H., Ferguson, D.J., Nicholls, L.G., Iredale, J.P., Pugh, C.W.,
Johnson, M.H., Ratcliffe, P.J. (1997):
Sites of erythropoietin production.
Kidney Int. 51, 393-401.
56. Maxwell, P.H., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Nicholls, L.G., Tan,
C.C., Doe, B.G., Ferguson, D.J., Johnson, M.H., Ratcliffe, P.J. (1993):
Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice.
Kidney Int. 44, 1149-1162.

57. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M. E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999):
The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen dependent proteolysis.

Nature 399, 271-275.

58. Means, R.T., Krantz, S. (1992):

Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease.

Blood 80, 1639-1647.

59. Moynagh, P.N., Williams, D.C., O'Neill, L.A.J. (1993):

Interleukin-1 activates transcription factor NF κ B in glial cells.

Biochem J. 294, 343-347.

60. Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H.B., Hatori, K., Kobayashi, S., Kim, S.U. (2001):

Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 60, 386-392.

61. Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., Pouyssegur, J. (1999):

p42/ p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF.

J. Biol. Chem. 274, 32631-32637.

62. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., Wenger, R.H. (1997):

Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1.

J. Biol. Chem. 272, 20055-20062.

63. Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B., Priller, J., Dirnagl, U., Meisel, A. (2002):
Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in brain: evidence from an in vitro model.
J. Neurosci. 22, 10291-10301.

64. Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., Sasaki, R. (1998):
Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 253, 26-32.

65. Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., Sasaki, R. (1998):
In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4635-4640.

66. Salceda, S., Caro, J. (1997):
Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.
J. Biol. Chem. 272, 22642-22647.

67. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):
Molecular cloning: a laboratory manual, Vol. 1-3. 2. Auflage. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

68. Sandau, K.B., Faus, H.G., Brüne, B. (2000):
Induction of hypoxia-inducible factor-1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 263-267.
69. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M., Schaffner, W. (1989):
Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells.
Nucleic Acids Res. 17, 6419.
70. Semenza, G.L. (1994):
Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis.
Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 8, 863-884.
71. Semenza, G.L. (2001):
Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology.
Trends Mol. Med. 7(8), 345-350.
72. Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. (1994):
Structure, regulation, and function of NF κ B.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 10, 405-455.
73. Sparacio, S.M., Zhang, Y., Vilcek, J., Benveniste, E.N. (1992):
Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF- κ B-like nuclear protein.
J. Neuroimmunol. 39, 231-242.

74. Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H., Hellwig-Bürgel, T. (2002):
Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β
involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.
FEBS Letters 512, 157-162.
75. Stolze, I., Berchner-Pfannschmidt, U., Freitag, P., Wotzlaw, C., Rossler, J.,
Frede, S., Acker, H., Fandrey, J. (2002):
Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells.
Blood 100, 2623-2628.
76. Tabata, M., Tarumoto, T., Ohmine K., Furukawa, Y., Hatake, K., Ozawa, K.,
Hasegawa, Y., Mukai, H., Yamamoto, M., Imagawa, S. (2001):
Stimulation of GATA-2 as a mechanism of hydrogen peroxide suppression in
hypoxia-induced erythropoietin gene expression.
J. Cell. Physiol. 186, 260-267.
77. Tran, K., Merika, M., Thanos, D. (1997):
Distinct functional properties of I κ B α and I κ B β .
Mol. Cell Biol. 17, 5386-5399.
78. Tsuchiya, T., Okada, M., Ueda, M., Yasukochi, Y. (1997):
Activation of the erythropoietin promotor by a point mutation from GATA to TATA
in the -30 region.
J. Biochem. Tokyo 121, 193-196.
79. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. (1995):
Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated
by cellular O₂ tension.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5510-5514.

80. Wenger, R.H. (2002):

Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.

FASEB J. 16, 1151-1162.

81. Wiener, C.M., Booth, G., Semenza, G.L. (1996):

In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 225, 485-488.

82. Wolff, M., Fandrey, J., Jelkmann, W. (1993):

Microelectrode measurements and pericellular PO₂ in erythropoietin-producing hepatoma cell cultures.

Am. J. Physiol. 265, C1266-C1270.

83. Wollman, Y., Westphal, G., Blum, M., Simantov, R., Blumberg, S., Peer, G., Chernihovsky, T., Friedrich, E., Iaina, A. (1996).

The effect of recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line.

Life Sci. 59, 315-322.

84. Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M., Cohen, B. (1998):

Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 alpha/ ARNT.

EMBO J. 17, 5085-5094.

85. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., Semenza, G.L. (2000):

Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/ phosphatidylinositol 3-kinase/ PTEN/ AKT/ FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.

Cancer Res. 60, 1541-1545.

86. Zundel, W., Schindler, C., Haas, K.D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D., Giaccia, A.J. (2000):

Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression.

Genes Dev. 14, 391-396.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOX	Anoxie
ARNT1	AhR Nuclear Translocator1
bp	Basenpaare
cDNS	komplementäre DNS
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EPO	Erythropoietin
FCS	Fetales Kälberserum
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTC	Guanidiniumisothiocyanat
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
HOX	Hypoxie
IL-1 β	Interleukin-1 β
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNS	Botenribonukleinsäure
MTT	3(4,5-dimethylthiazyl-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
NB	Neuroblastom
NF κ B	Nuclear Factor kappa B
NOX	Normoxie
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
UV	Ultraviolett

Medien für die Zellkultur

Kelly-Zellen

RPMI 1640 (BioWhittaker Europe)
+ 10% fetales Kälberserum (Gibco BRL)
+ 2,2 g/l Natriumbikarbonat
+ 2 mM L-Glutamin
+ 100 E/ml Penicillin (Gibco)
+ 100 µg/ml Streptomycin (Gibco)

HepG2-Zellen

s. Kelly-Zellen

Ba/F3-Zellen

RPMI 1640 (BioWhittaker Europe)
+ 10% fetales Kälberserum (Gibco BRL)
+ 2,2 g/l Natriumbikarbonat
+ 2 mM L-Glutamin
+ 0,5 E/ml Erythropoietin (Roche)
+ 1% β-Mercaptoethanol

Lösungen für den MTT-Test

PBS pH 7,4

136,9 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄ * H₂O
1,5 mM KH₂PO₄

SDS

5 g SDS (Roth)
ad 1l 0,1 M NaOH

MTT

250 mg MTT (Sigma)
ad 50 ml PBS

Lysingpuffer	100 ml Dimethylformamid (Merck) 2,5 ml 80% Essigsäure 2,5 ml 1N HCl 40 g SDS 100 ml aqua dest.
--------------	--

Lösungen zur RNS-Extraktion

0,1% DEPC a. dest.	0,5 ml Diethylpyrokarbonat (Sigma) ad 500 ml aqua dest 30 Minuten rühren, autoklavieren
3 M NaOAc pH 5,2	24,61 g NaOAc wasserfrei ad 100 ml DEPC a. dest pH mit Eisessig einstellen
2 M NaOAc pH 4,0	16,14 g NaOAc wasserfrei ad 100 ml DEPC a. dest pH mit Eisessig einstellen
4 M GTC	236,25 g Guanidiniumthiocyanat (Roth) 4,18 ml 3 M NaOAc pH 5,2 ad 500 ml a. dest. filtrieren: Whatman No. 1 + 3,75 ml β - Mercaptoethanol (Sigma)
Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol	Fertiglösung (Sigma)

Phenol pH 4,5 Fertiglösung (Sigma)

β - Mercaptoethanol Sigma

Isopropanol 100% (J. T. Baker)

Ethanol 100% (J. T. Baker)

Ethanol 75%

Puffer für Reverse Transkription und Qualitative PCR

5x RT- Puffer Promega





dNTP-Mix	25 µl dATP 100 mM (Promega)
	25 µl dCTP 100 mM (Promega)
	25 µl dGTP 100 mM (Promega)
	25 µl dTTP 100 mM (Promega)
	+ 900 µl aqua dest.

Reverse Transkriptase M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/μl
(Promega)

1x PCR-Puffer	10x PCR-Puffer (Gibco)
---------------	------------------------

MgCl₂ 50 mM (Gibco)

Taq Polymerase 100 Units	Taq Polymerase 5U/μl (Gibco)
Hum. EPO-Primer 5'	EPO C, Invitrogen Sequenz: tct ggg agc cca gaa gga agc cat
Hum. EPO-Primer 3'	EPO 8R, Invitrogen Sequenz: ctg gag tgt cca tgg gac ag

DNS-Gelelektrophorese

500 mM EDTA pH 8,0	186,1 g EDTA (Fluka) ad 1l a. dest. pH-Einstellung mit konzentrierter HCl (Merck)
50x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig (Merck) 100 ml 500 mM EDTA pH 8,0
Laufpuffer	1x TAE-Puffer
Ethidiumbromidlösung	100 mg Ethidiumbromid (Roth) ad 10 ml a. dest
1% Agarosegel	1,5 g Agarose (Invitrogen) mit 150 ml 1x TAE aufkochen + 3 μl Ethidiumbromid 10 mg/ml

Reagenzien bei der real-time PCR

SYBR-Green®	(Eurogentec)
Mastermix	(Eurogentec)
Primer hum. Epo 5'	(Invitrogen, tga gca tgc cca gga tac ct)
Primer hum. Epo 3'	(Invitrogen, ggc caa agc aga tga gca g)
Primer rib. Prot. 5'	(Invitrogen, acg agg tgt gca agg agg gc)
Primer rib. Prot. 3'	(Invitrogen, gca agt cgt ctc cca tct gc)
Standards hum. Epo	(aus cDNS isoliert, Gene Elude, Roche)
Standards rib. Prot.	(aus cDNS isoliert, Gene Elude, Roche)

Präparation von DNS-bindenden Proteinen

PBS	s. oben
100 mM PMSF	174 mg Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma) ad 10 ml Isopropanol
100 mM DTT	309 mg Dithiothreitol (Sigma) ad 20 ml 10 mM NaOAc pH 5,2
100 mM MgCl ₂	2,03 g MgCl ₂ ad 100 ml a. dest.

100 mM KCL

1M NaCl

Lysis-Puffer A

Lysis-Puffer B

Western-Blot

Acrylamid/Bisacrylamid	30% Fertiglösung (Bio-Rad)
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	181,7 g Tris-Base ad 1l a.dest. pH-Einstellung mit konzentrierter HCl
0,5 M Tris-Puffer pH 6,8	60,6 g Tris-Base ad 1l a. dest. pH-Einstellung mit konzentrierter HCl
10% SDS	10 g Natriumdodecylsulfat (Roth) ad 100 ml a.dest.
10% APS	100 mg Ammonium-peroxodisulfat (Fluka) ad 1 ml a. dest. immer frisch ansetzen
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin gebrauchsfertige Lösung (Bio-Rad)

Zusammensetzung für zwei Minigele

Trenngel 7,5%	4,9 ml a. dest. 2,5 ml Acrylamidlösung 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10% SDS 50 µl APS 5 µl TEMED
---------------	--

Sammelgel 5%	2,9 ml a.dest.	
	0,83 ml Acylamidlösung	
	1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8	
	50 µl 10% SDS	
	25 µl APS	
	5 µl TEMED	
4x Probenpuffer	0,4 ml a. dest	
	1,6 ml 0,5 M Tris pH 6,8	
	3,2 ml 10% SDS	
	0,8 ml β-Mercaptoethanol	
	0,4 ml 0,05% Bromphenolblau	
	1,6 ml 10% Glycerin	
5x Laufpuffer	125 mM Tris	(15 g Tris-Base)
	960 mM Glycin	(72 g Glycin)
	5% SDS	(5 g SDS)
	ad 1l a. dest.	
Blotpuffer	25 mM Tris	(3 g Tris-Base)
	192 mM Glycin	(14,4 g Glycin)
	20 vol% Methanol	(200 ml Methanol)
	ad 1l a.dest.	
TBS-T pH 7,4	25 mM Tris	(3 g Tris-Base)
	136 mM NaCl	(8 g NaCl)
	37 mM KCl	(0,2 g KCl)
	ad 1l a. dest.	

Chemilumineszenzlösung für die Detektion der Meerrettich-Peroxidase:

5 µl 30% H₂O₂

50 µl 250 mM Luminol

25 µl 90 mM p-coumaric
Säure

Detektionspuffer

Transiente Transfektion

Serum-freies Medium	RPMI 1640 (BioWhittaker Europe) + 2,2 g/l Natriumbikarbonat + 2 mM L-Glutamin + 100 E/ml Penicillin (Gibco) + 100 µg/ml Streptomycin (Gibco)
1x Lysispuffer	Fertiglösung 5x Lysispuffer (Promega) verdünnen
Luciferasesubstrat	Promega 1: 3 verdünnen

Zytokine und NO-Donator

TNF α	Calbiochem
IL-1 β	Calbiochem
GSNO	Prof. B. Brüne, Inst. für Biochemie, Kaiserslautern

Danksagung

Die Erarbeitung und Verfassung dieser Dissertation wäre ohne die kompetente und geduldige Unterstützung einer Vielzahl von Menschen meines beruflichen und privaten Umfeldes nicht möglich gewesen. Diesen Personen möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank zum Ausdruck bringen.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. J. Fandrey, Direktor des Instituts für Physiologie des Universitätsklinikums Essen. Er ermöglichte mir die Durchführung der Arbeit und begleitete diese geduldig von Anfang bis zu den letzten Korrekturen. Für die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Durch ihre intensive Betreuung waren Frau Dr. med. I. Stolze und Frau Dr. rer. nat. S. Frede maßgeblich am Gelingen der Dissertation beteiligt. Stets standen sie bei Fragen und Problemen mit konstruktiver Kritik und fachlicher Diskussion zur Verfügung. Mein herzlicher Dank gilt ihnen außerdem für die Einarbeitung in die experimentelle Methodik und ihre hilfsbereite und engagierte Mitarbeit.

Meinen Dank spreche ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des physiologischen Instituts des Universitätsklinikums Essen aus, insbesondere Frau P. Freitag, Frau S. Lauterbach und Frau B. Trinidad. Ihnen danke ich für die praktischen Ratschläge während des experimentellen Teils der Dissertation, die hervorragende technische Assistenz und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Der Internen Forschungsförderung der Universität Duisburg - Essen möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des IFORES - Stipendiums danken.

Für das genaue und schnelle Korrekturlesen danke ich Frau cand. med. A. Fritz.

Meiner Mutter R. Fritz und meiner Großmutter T. Fritz gilt mein uneingeschränkter Dank für ihre jahrelange Unterstützung. Diese weit über das materielle hinausgehende Förderung hat die vorliegende Arbeit erst ermöglicht.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name:	Stefanie Waltraud Fritz
Geburtsdatum:	26. Januar 1979
Geburtsort:/Wohnort:	Essen
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch - katholisch

Schulausbildung:

1985 - 1989	Cranachgrundschule in Essen
1989 - 1998	B.M.V. - Gymnasium in Essen
Juni 1998	Abitur

Hochschulbildung

WS 1998/99 - SS 2004	Medizinstudium an der Universität Duisburg - Essen
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
September 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 2003	Posterpreisträgerin am Forschungstag der Uni. D.-E.
September 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 2003/04 - SS 2004	Praktisches Jahr am Alfried Krupp KH in Essen
Oktober 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Erteilung der Approbation als Ärztin
WS 2004/05	Dissertationssemester

Beruflicher Werdegang:

Seit 15. April 2005	Assistenzärztin in der Chirurgie des Alfried Krupp Krankenhauses in Essen
---------------------	---